MEMORIAS

DO

INSTITUTO BUTANTAN

1931

TOMO VI

São Paulo, Brasil
Caixa Postal, 65

INDICE

PREÇO DO TOMO VI — 10$000

MEMORIAS

DO

INSTITUTO BUTANTAN

1931

TOMO VI

São Paulo, Brasil
Caixa Postal, 65

INDICE

PREÇO DO TOMO VI — 10$000

NOTICIARIO

No periodo decorrido entre a publicação do tomo V destas Memorias e o presente tomo VI foi decretada officialmente a reorganização geral, technica e administrativa, do Instituto Butantan, iniciada em março de 1928 por sua actual superintendencia, de accordo com o programma que, naquella occasião, fôra por ella apresentado á apreciação do governo do Estado. Por essa reorganização, o Instituto Butantan foi definitivamente desannexado da Directoria Geral do Serviço Sanitario do Estado e transformado em um estabelecimento de medicina experimental, dedicado especialmente a trabalhos de pathologia humana, com os seguintes objectivos:

1 — realizar toda sorte de trabalhos scientificos sobre animaes venenosos;

2 — estudar questões referentes á pathologia humana ou a ella applicaveis, investigando especialmente os phenomenos de immunidade e outros que surgirem no decurso dos trabalhos, de accordo com a tradição do estabelecimento;

3 — preparar productos biologicos necessarios á defesa sanitaria e substancias empregadas em therapeutica humana;

4 — realizar investigações sobre plantas medicinaes brasileiras, tratando de insular seus principios activos applicaveis em medicina humana, aproveitando as installações do antigo Horto "Oswaldo Cruz";

5 — fiscalizar o commercio de productos biologicos, aferindo aquelles que tiverem applicação na therapeutica ou na prophylaxia de enfermidades humanas;

6 — realizar excursões scientificas ao interior para o estudo de molestias, dentro das finalidades do Instituto;

7 — installar e manter postos anti-ophidicos ou filiaes onde fôr julgado conveniente, afim de estender ás zonas ruraes o beneficio de sua influencia;

8 — organizar e manter cursos praticos de especialização e de divulgação scientifica, dentro de suas finalidades;

9 — divulgar amplamente, por meio de publicações, os resultados de seus estudos;

10 — estabelecer contacto e permula com outros centros scientificos, para manter-se em dia com os progressos de medicina experimental;

11 — cobrar as taxas fixadas pelo regulamento de fiscalização de productos biologicos;

12 — acceitar doações, mediante prévia auctorização do Governo.

Para consecução desses objectivos, as actividades do Instituto ficaram affectas a duas ordens de serviços: a) administrativos, comprehendendo a Directoria e as secções de Administração, Animaes immunizados, Culturas e Obras; b) technicos, sob a superintendencia do director e distribuidos pelas secções seguintes:

1 — Ophiologia e Zoologia Medica.

2 — Immunologia Experimental e Sorotherapia, com as sub-secções de Sorotherapia: anti-venenosa, anti-toxica e anti-bacteriana.

3 — Bacteriologia Experimental e Bacteriotherapia.

4 — Virus e Virustherapia.

5 — Physico-chimica Experimental.

6 — Protozoologia e Parasitologia.

7 — Botanica Medica.

8 — Chimica e Pharmacologia Experimentaes.
9 — Physio-pathologia Experimental, com as sub-secções: Physiologia. Endocrinologia e Histologia Pathologica.
10 — Cytologia, Embryologia e Genetica Experimental.

Dessas secções as seis primeiras foram logo providas com technicos e organizadas, começando a trabalhar independentemente, embora articuladas em suas finalidades por intermedio da superintendencia. As restantes, entre as quaes a de Cytologia, Embryologia e Genetica Experimental — de cuja installação para pesquisas autonomas o Instituto Butantan foi o primeiro estabelecimento scientifico do Brasil a cogitar — o decreto determinou que seriam organizadas á medida da necessidade dos serviços e de accordo com os recursos financeiros do Estado.

Afim de permittir o mais rapido desenvolvimento das actividades do Instituto em beneficio da collectividade, no que diz respeito ao estudo de enfermidades humanas, á defesa biologica da população e outras finalidades suas de igual importancia, ficou estabelecido em lei que o excesso de producção de soros, bacterinas, vaccinas e outras substancias que vier a preparar, o Instituto Butantan o entregaria á venda, revertendo o resultado, conjunctamente com a renda de analyses e de outras actividades suas, em proveito do estabelecimento. Por isso, o Instituto começou a tratar de desenvolver sua producção industrial e agricola e outros recursos, capazes de lhe permittir alcançar logo o equilibrio financeiro. Um dos pontos capitaes dessa reforma foi a annexação, pela primeira vez ensaiada em nosso meio, dos trabalhos de pesquisa aos de producção, a cargo de technicos differentes mas que collaboram entre si, completando-se mutuamente, em uma mesma secção, com a necessaria amplitude de acção e articulados com os serviços de contabilidade, o que permitte á administração manter o necessario control da situação financeira do Instituto.

Presentemente, o pessoal superior encarregado de serviços technicos do Instituto Butantan é o seguinte:

Director superintendente — Afranio do Amaral, B. Sc. & L., D. M., D. Hyg. (Med. Trop., Harvard), Editor das "Memorias do Instituto Butantan".

Assistentes chefes: José B. Arantes, dipl. Phcia., D. M.
J. Lemos Monteiro, B. Sc. & L., D. M.
S. Camargo Calazans, D. M.
Dionysio von Klobusitzky, D. M.

Assistentes: Raul B. Godinho, D. M.
Joaquim Travassos, B. Sc. & L., D. M.
Cicero Neiva, B. Sc. & L., Med. Vet..
Alcides Prado, B. Sc. & L., D. M.
Flavio da Fonseca, D. M.

Toda correspondencia scientifica, relativa ás "Memorias", deve ser dirigida ao

EDITOR, MEMORIAS DO INSTITUTO BUTANTAN
CAIXA POSTAL 65
SÃO PAULO, BRASIL

ESTUDOS
SOBRE O TYPHO EXANTHEMATICO DE SÃO PAULO

POR

J. LEMOS MONTEIRO

(*com 54 graphicos, 6 estampas com 9 photographias, sendo 1 colorida, 17 desenhos coloridos e 2 microphotographias*)

SUMMARIO

1.ª Parte

Comportamento experimental e propriedades do virus

2.ª PARTE

A "Rickettsia brasiliensis" e suas relações com a infecção

614.526:614.47

ESTUDOS SOBRE O TYPHO EXANTHEMATICO DE SÃO PAULO

POR

J. LEMOS MONTEIRO

1.ª PARTE

Comportamento experimental e propriedades do virus

Capitulo I

Introducção

O presente trabalho representa o resultado de estudos realizados durante o anno de 1931 e primeiro semestre de 1932 e que foram resumidos numa serie de notas publicadas *in* "Brasil Medico", algumas tambem apresentadas ao 2.° Congresso Internacional de Pathologia Comparada, reunido em Paris em outubro ultimo.

Outros aspectos do problema do typho exanthematico de S. Paulo, como sua transmissibilidade, depositarios do virus na natureza, etc., da mesma forma, foram objecto de pesquisas que realizámos com a collaboração de distinctos collegas do Instituto, tendo sido tambem resumidos em notas já publicadas ou apresentadas á Sociedade de Medicina e Cirurgia de S. Paulo (Semana de Laboratorio, janeiro de 1932) e á Sociedade de Biologia de S. Paulo, constituindo assumptos de outros trabalhos mais pormenorizados.

Em algumas das nossas notas já publicadas *in* Brasil Medico, vol. XLV, n.° 35, pag. 805, 1931; C. R. Soc. Biologie, vol. CVIII, n.° 30, pag. 521, 1931; Communicações ao 2.° Congresso Intern. Path. Comp. Paris, outubro de 1931; Brasil Medico. vol XLV, ns. 47, 48, 49, 50 e 51, pags. 1096, 1109, 1140, 1163 e 1188, 1931; vol. XLVI, n.° 3, pag. 49, 1932, foi adoptada a designação de "typho endemico de S. Paulo", que foi convenientemente justificada. Tendo,

porém, surgido controversias sobre esta denominação, como passivel de confusão, de um lado, com a febre typhoide e, de outro, com o typho endemico da America do Norte (Mexico e Estados Unidos), resolvemos, de accordo com collegas que entre nós têm tambem estudado a nova modalidade do "typhus" que surgiu no nosso Estado, empregar a primitiva designação de "typho exanthematico de S. Paulo".

Dada a enorme complexidade e confusão reinantes na nomenclatura das chamadas *febres exanthematicas* ou *typhus*, nem sempre de accordo com os preceitos internacionaes de nomenclatura já acceitos, uma revisão completa do assumpto se impõe, por muitos motivos facilmente comprehensiveis. Esse grupo de infecções melhor se designaria pelo nome generico de *rickettsioses*, adoptando-se para o caso da modalidade observada em S. Paulo o nome de *Rickettsiose brasileira*, conforme Afranio do Amaral e Cesar Pinto propuseram por occasião da discussão deste assumpto numa das sessões da Sociedade de Medicina e Cirurgia de S. Paulo (Semana de Laboratorio, janeiro de 1932).

Expondo em conjuncto e mais pormenorizadamente, como agora fazemos, os resultados dos nossos estudos experimentaes, visamos apenas facilitar a tarefa dos que desejarem estudar experimentalmente um assumpto particularmente importante para o nosso Estado e para o país. Si este escopo for attingido, considerar-nos-emos compensados dos esforços, dedicação e labor dispendidos durante mais de um anno de pesquisas continuas.

Retardada a publicação do presente numero das nossas "Memorias", por motivos independentes da nossa vontade, tendo sido os originaes entregues em fins de 1931, o trabalho foi completado e ampliado, quer no texto, quando possivel, quer em notas ao pé das paginas, com novos dados e observações oriundas de experiencias feitas posteriormente, não lhe alterando, porém, a primitiva feição nos seus principaes resultados e conclusões.

*
* *

Nestes ultimos annos, o problema do typho exanthematico em geral, ou das chamadas "febres exanthematicas" que abrangem todo um grupo de infecções dotadas de certas affinidades, vem despertando crescente interesse, tanto sob o ponto de vista scientifico, como pelo lado propriamente medico-social. Esse interesse está ligado á descripção e individualização, em differentes partes do mundo, de um certo numero de infecções que, embora apresentem pontos de affinidade com o "typhus" classico do velho mundo, delle se differenciam pelo aspecto clinico, caracter epidemiologico e feição experimental, o que lhes valeu algumas vezes serem consideradas, não como meras transformações da-

quella entidade morbida, mas como doenças autochtonas de determinadas regiões. Com effeito, embora o estudo retrospectivo e historico possa, com relação a algumas, mostrar uma ligação original com o typho europeu, é provavel que, com o decorrer do tempo e em virtude talvez de adaptações a novas condições e ambientes, o mal tenha adquirido uma individualização propria.

Em relação ao continente americano, este problema tem merecido interesse de varios pesquisadores, principalmente no hemispherio norte; no do sul, com excepção de alguns paises onde o assumpto já tem figurado em ordem do dia, pouco se tem feito, principalmente sob o ponto de vista experimental. Isto se deve attribuir a muitos factores, como, entre outros, ás deficiencias das organizações sanitarias locaes, cujo raio de acção raramente transpõe os limites das capitaes e das grandes cidades, e á escassez de recursos para o estabelecimento de diagnostico seguro, com a qual lutavam e ainda frequentemente lutam os clinicos, especialmente nas zonas afastadas e, ás vezes, até em grandes centros. Por esta razão é que, removidas essas causas, se tem ás vezes a impressão de surgirem novas doenças que, reinando em verdade ha longo tempo, eram identificadas com os males mais em voga na occasião ou com os que clinicamente mais se lhes approximassem.

Desde 1929, quando foi diagnosticada, vem surgindo em São Paulo uma infecção do typo das referidas "febres exanthematicas", mas que apresenta uma individualidade propria, pelo aspecto clinico, caracter epidemiologico e pelo comportamento experimental. Neste trabalho, dividido em duas partes e dez capitulos, esta infecção, o *typho exanthematico de S. Paulo,* será estudada relativamente ao comportamento experimental de seu "virus" em relação aos animaes de laboratorio e quanto ao seu aspecto etiologico, com a descripção e estudo das suas relações com a rickettsia responsavel, a *Rickettsia brasiliensis* Monteiro, 1931.

Antes, porém, faremos algumas considerações sobre o grupo de infecções exanthematicas conhecidas e já estudadas no continente americano.

1. - Grupo das febres "typho-exanthematicas" na America:

O estudo deste grupo de infecções no novo mundo deve ser encarado separadamente com referencia á America do Norte e á America do Sul.

a) *Continente septentrional.* - No continente norte-americano podemos considerar como demonstrada a existencia de 3 typos de infecções pertencentes a este grupo. Em primeiro logar, o "typho classico", importado do velho mundo com a immigração européa; em segundo logar, o "typho endemico", conhecido em certas regiões do sul dos Estados Unidos e no Mexico, onde é chamado de "tobardillo" ou de "typho mexicano"; finalmente, a "febre maculosa das Montanhas Rochosas".

O typho exanthematico classico, embora sob um aspecto clinico benigno, parece ter sido o observado por Brill (1) em 1910, quando descreveu pela primeira vez numerosos casos, surgidos em Nova York, de uma infecção de natureza desconhecida.

Em 1912, Anderson e Goldberger (2) procuraram demonstrar a provavel identidade desta infecção, que foi denominada "doença de Brill", com o typho endemico do Mexico, embora este modo de pensar não fosse logo por todos acceito. Em 1923, Maxcy (3), lançando mão principalmente de experiencias de immunização cruzada, tentou provar a identidade de ambas estas enfermidades com o typho do velho continente, apesar das differenças observadas no comportamento experimental dos "virus" e em certos aspectos epidemiologicos das infecções em apreço, havendo tambem descripto a forma do typho endemico nos estados do sul.

Mooser (4), porém, oppôs-se a essa generalização, mostrando que a denominação de "doença de Brill" deve ser reservada unicamente para uma forma benigna do typho classico, de importação, representada pelos casos descriptos por Brill em Nova York, e que não deve ser confundida com o typho endemico, existente em certos estados do sul e sudeste da União Americana e no Mexico. Apesar disso, ainda hoje muitos auctores consideram como "doença de Brill" o typho endemico nos Estados Unidos. Todavia, o typho endemico da America do Norte deve ser restricto á variedade conhecida em certos paises por "tobardillo" e cuja zona de expansão se extende do planalto do Mexico até as regiões baixas dos Estados Unidos, mormente o Texas, Alabama, Georgia e provavelmente outros estados do sul.

Esta forma talvez seja autochtona no continente americano, pelo menos no hemispherio norte, onde parece ter sido conhecida pelos indios antes da chegada dos espanhóes, caracterizando-se, além do mais, por seu comportamento experimental, pois o seu "virus" provoca frequentemente, quando inoculado no peritoneo de cobaias, uma reacção inflammatoria escrotal. Esta reacção não se observa, segundo Mooser, na doença de Brill, que elle, como outros, considerava como o typho classico de natureza benigna, observado nos Estados Unidos. Hoje, porém, está verificado que certa reacção escrotal pode ser observada, ás vezes, com o typho europeu, embora nunca apresente ella a intensidade e a constancia observadas no typho endemico da America do Norte.

A reacção no "tobardillo" caracteriza-se por uma proliferação endothelial e infiltração na *tunica vaginalis* do testiculo e especialmente na folha parietal, provocada pela presença de microorganismos intra-cellulares, descriptos por Mooser (5) e que se assemelham á *Rickettsia prowazeki*, sendo tambem designados "corpusculos de Mooser". O conceito moderno sobre as relações entre estas formas da infecção será exposto no capitulo VI.

O "tobardillo" ou o typho endemico dos Estados Unidos differe ainda do typho do velho mundo pela ausencia ou raridade das lesões nodulares observadas no cerebro dos animaes inoculados, as quaes são muito frequentes no segundo. Os outros elementos usados na distincção destes typos de typho serão com mais pormenor tratados opportunamente.

Finalmente, quanto ao terceiro typo de infecções do grupo exanthematico, observado no hemispherio norte, a febre maculosa das Montanhas Rochosas, sua zona de expansão está indicada pelo proprio nome, pois corresponde principalmente aos estados de Montana, Idaho, Arizona e outros, apesar de que, pelo que se deprehende de um estudo recente de Badger, Dyer e Rumreich (6), sua expansão e frequencia nos Estados Unidos (ou de alguma infecção affim) talvez seja bem maior do que geralmente se pensa. Differencia-se do "tobardillo" principalmente pelo aspecto epidemiologico e pelo comportamento experimental do "virus". Quanto a este ultimo aspecto, na febre maculosa se observa, nas cobaias, mesmo que o "virus" não seja inoculado no peritoneo, uma reacção escrotal, geralmente mais intensa, quasi sempre provocando hemorrhagias e necrose do escroto e, portanto, affectando a pelle do mesmo, o que só raramente acontece com o "tobardillo".

O "tobardillo", pois, o typho endemico da America do Norte, infecção autochtona, segundo Mooser, deve ser collocado entre o typho do velho mundo ou typho exanthematico classico, e a febre maculosa das Montanhas Rochosas. Seu estudo, sob differentes aspectos e comparativamente com o typho europeu, tem produzido na America do Norte uma grande serie de trabalhos experimentaes, cuja citação completa é desnecessaria, bastando mencionar os de Maxcy, Pinkerton, Mooser e os realizados ou orientados pelo professor Zinsser, em Boston.

b) *Continente meridional.* - Pelos motivos já mencionados, no continente sul-americano o problema das febres exanthematicas não mereceu ainda o interesse que despertou no norte, principalmente sob o ponto de vista experimental.

E' certo, segundo os historiadores, que o typho exanthematico foi pela primeira vez observado na America do Sul no Perú, em meados do seculo XVI, durante o reinado de Huaina Capac, celebre Inca, que foi victimado juntamente com outros membros de sua familia e cerca de 200.000 de seus subditos. O mal foi então, muito provavelmente, trazido pelos conquistadores espanhóes. Desde essa epoca, a infecção tem reinado endemicamente em certas regiões do continente. Com relação ao Perú, o facto está seguramente averiguado e já referido em trabalhos apresentados ao 5.° Congresso Medico Latino-Americano, reunido em Lima, em 1913 (J. Gonzalez Mendoza, G. Arosemena e outros), o mesmo podendo-se dizer com relação a certas regiões do norte do Chile.

Relativamente á Bolivia, a existencia da endemicidade do mal é muito provavel. Foi suspeitada quanto a certas partes da Argentina, em 1916, por A.

Neiva e B. Barbará (7), durante uma viagem de estudos que realizaram nas provincias do norte do país. Esta endemicidade do typho na Argentina septentrional foi confirmada em 1918 por Kraus, Battaglia e Barbará (8), que estudaram um surto epidemico na localidade de Molinos, provincia de Salta, localizando o fóco endemico no valle Calchaqui, na mesma provincia.

Battaglia e Barbará (7) assim se manifestaram em seu trabalho: "En el transcurso de nuestras investigaciones, que no fué cosa facil praticarlas, a causa de la falta de toda ducumentacion oficial o privada, no fué mayor la primer sorpresa con el hallazo del tifus petechial que reinaba en forma epidemica en la region, sino después de comprobar que dicha enfermidad pertenecia a la morbilidad corriente desde quien sabe cuantos años atrás, como endemia benigna".

Além desta forma do typho endemico, autochtona de certas regiões do norte do país, o typho classico tambem appareceu na Argentina em 1896, em Entre Rios, trazido por immigrantes russos (8).

Com respeito ao Brasil, não conhecemos estudo algum referente á existencia de alguma infecção do grupo das febres typho-exanthematicas, até que se registrassem em São Paulo, em 1929, os primeiros casos de uma infecção que, com elementos mais ou menos seguros, foi então diagnosticada como typho exanthematico, continuando até agora a surgir de um modo esporadico em certas zonas da cidade, o que provavelmente vinha de ha muito acontecendo (*). Esta infecção tem todos os caracteristicos de uma nova modalidade a distinguir-se do typho classico do velho mundo, pelo seu aspecto clinico, epidemiologico e experimental. A designação de "typho exanthematico de São Paulo" foi justificada pelos drs. J. T. Piza, F. e L. Salles Gomes, J. Fleury, J. Meyer, J. Castro, C. Rodrigues e H. da Rocha Lima (9), em uma nota apresentada á Sociedade de Biologia de São Paulo, na qual mostraram alguns caracteristicos da infecção e sua differenciação do typho exanthematico europeu. A infecção tem-se manifestado, desde então, em forma endemica no municipio da Capital, principalmente em zona suburbana ou rural da cidade; os casos têm surgido esporadicamente, não sendo impossivel, em todo caso, o apparecimento de surtos epidemicos, si certas condições o favorecerem.

O essencial será estabelecer as relações entre estas formas de infecções e as do hemispherio norte, para se ter a certeza da existencia, tambem no hemispherio sul, do typho endemico, talvez autochtono, provavelmente encontrado em varios outros países.

E' possivel que a natureza do typho endemico do Perú, Chile, Bolivia e Argentina, embora escassos os estudos experimentaes, se relacione com a do typho europeu, que originariamente grassou, como vimos, no Perú, no seculo

---

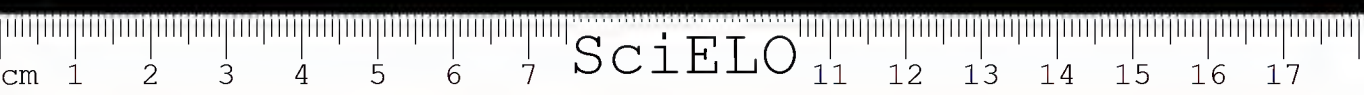
(*) Informou-nos J. T. Piza ter já estudado, em annos anteriores, dois casos para os quaes poude firmar o diagnostico de typho exanthematico.

XVI, si bem que tenha adquirido uma feição propria, variando, talvez, segundo as differentes regiões. Isto parece ser verdadeiro pelo menos em relação ao typho endemico da Argentina, em virtude do que se deprehende dos trabalhos de Kraus e Barrera (11), que o estudaram experimentalmente, verificando ser a reacção de Weil-Felix positiva em 94% dos casos e provocar o virus na cobaia uma reacção febril "por completo semejante a la descripta por los autores con el virus de Europa, Africa e Norte America", e accrescentando ser identico o comportamento experimental da febre petequial no Chile e no Perú, de accordo, neste ultimo pais, com informações prestadas aos auctores pelo dr. E. Ribeyro, de Lima. Kraus e Barrera julgam que "la fiebre petequial en Sud America (Perú, Bolivia, Argentina y Chile) es producida por un virus que, a semejanza del de Europa, Africa y en Méjico, determina en el chanchito un ascenso caracteristico de la curva térmica (termoreación)". Identicas consideram tambem os dois auctores as lesões histopathologicas da pelle e as infiltrações perivasculares observadas no cerebro dos doentes, embora não as reputem especificas do typho; relativamente á infecção experimental, verificaram lesões semelhantes "en el cerebro y las meninges de los chanchitos infectados pero sin ser constantes ni guardar relación alguna con los pasajes".

Talvez pela epoca em que foi feita, a descripção, dada por Krauss e Barrera, do comportamento experimental dos "virus" argentino e chileno, responsaveis pelo typho endemico destes paises, é insufficiente para se julgar com segurança quanto á natureza de ambos, embora esses auctores os considerem semelhantes ao "virus" do velho mundo, ao qual tambem filiam *a priori* o typho mexicano e o typho endemico da America do Norte. Em todo caso, alguns pormenores da descripção por elles feita, como a inconstancia de lesões nodulares no cerebro das cobaias infectadas, parecem approximar o typho que estudaram do typho endemico do norte (Estados Unidos e Mexico), e separal-o do typho do velho continente, no qual aquellas lesões, como se sabe, são bem constantes.

Somente novos estudos experimentaes, orientados de accordo com os modernos conhecimentos sobre este grupo de infecções, estabelecerão a natureza exacta do typho endemico do norte da Argentina e do Chile, Perú e Bolivia, elucidando si deverão ser considerados como infecções autochtonas do nosso hemispherio, iguaes ou differentes nos varios paises, ou si têm a sua origem em virtude de uma importação do velho continente, havendo, porém, adquirido já individualidade propria que lhes daria fóros de doenças especiaes.

Estes estudos justificar-se-iam ainda pelos resultados das investigações, principalmente de natureza experimental, que vêm sendo realizadas com o typho exanthematico de São Paulo.

Este é uma infecção provavelmente autochtona, com epidemiologia propria, e, assim, de grande valor seria verificarem-se as suas relações com as formas do typho endemico já conhecidas nas Americas do Norte e do Sul, e

a sua possivel existencia em outras regiões do nosso territorio e em outros paises do continente americano; si se trata de uma entidade morbida nova ou, pelo contrario, si poderá ser identificada a alguma já descripta, ou á infecção que Badger, Dyer e Rumreich estudaram nos Estados Unidos, considerando-a muito proxima da febre maculosa das Montanhas Rochosas, com a qual, aliás, em trabalho mais recente, chegam a identifical-a (12), apesar de o nosso typho apresentar certos caracteres differenciaes, que serão estudados opportunamente.

2. - Relações sorologicas entre as differentes formas do typho.

Embora clinicamente apresentem certa semelhança com o typho classico, isto é, o typho exanthematico do velho continente, as diversas formas do "typhus" delle divergem em outros aspectos, como tambem apresentam differenças entre si, de accordo com as varias regiões do mundo onde têm sido descriptas e estudadas.

Estas differenças, relativamente ao typho endemico, accentuam-se, principalmente, quanto á epidemiologia. Não apresenta, geralmente, tendencia a uma rapida disseminação, não ha evidencia segura de que se transmitte somente por intermedio de piolhos e, alem disto, é muito provavel a existencia de algum outro intermediario ainda não bem conhecido.

Outro elemento que poderia servir para o estudo das relações entre as diversas formas entre si e o typho classico, seria a reacção sorologica de Weil-Felix. Segundo estudos conhecidos, a reacção se manifesta positiva em 95% dos casos de typho endemico (doença de Brill) dos Estados Unidos (Havens, 1927), em 100% dos casos de typho endemico da Australia (Hone, 1927; Buil, 1923 e Wheatland, 1926).

Com respeito ao typho tropical dos Estados Malaios, Fletcher (13) e collaboradores (Lessler, Field, Lewthwaite) verificaram, entre os doentes, dois grupos sorologicos: o primeiro, que dava agglutinação positiva com o *Proteus* X19 (amostra Varsovia) e representado pelos casos de zona urbana que denominaram grupo W"; e o segundo, constituido pelos casos de zona rural e que somente davam reacção positiva com a amostra K (Kingsbury) do X19, que designaram "grupo K".

Recentemente, em virtude da diversa epidemiologia entre estes dois grupos de infecção, passaram a chamar o grupo urbano (W) de "Shop-typhus" e o grupo rural (K) de "Scrub-typhus".

Estas verificações sorologicas de Fletcher e collaboradores são da maior importancia, abrindo novos horizontes para o estudo das relações entre estes differentes typos de infecção.

E' preciso dizer que o typo K (Kingsbury) do *Proteus* X19 é uma variante deste, obtida originalmente pelo dr. Kingsbury, da "National Collections

of Type Cultures", e constitue um novo typo do *Proteus*, que não produz indol e não fermenta a saccharose e maltose, para o qual Felix e Rhodes dão a designação de *Proteus* XK.

Felix e Rhodes (14) confirmaram estas observações de Fletcher, verificando tambem que as agglutininas do typo O eram as responsaveis pela reacção, tanto do *Proteus* X19 para o grupo W, como do *Proteus* XK para o grupo K do typho malaio, conforme já se sabia com referencia ao Weil-Felix no typho classico. Estes auctores verificaram ainda que as mesmas agglutininas do typo O eram responsaveis pela reacção positiva com o *Proteus* XK na "tsutsugamushi".

Em virtude de trabalhos recentes de Spencer e Maxcy sobre a reacção de agglutinação na febre maculosa das Montanhas Rochosas e no typho endemico dos Estados Unidos, Felix e Rhodes acreditam, relativamente á primeira, em duas alternativas: 1.ª não ser o virus da febre maculosa antigenicamente uniforme, dividindo-se em variedades sorologicas como Fletcher e Lessler estabeleceram para o typho tropical malaio; 2.ª o antigeno do virus poder, então, corresponder a outro typo de *Proteus*, alem dos tres já conhecidos.

Na Africa do Sul já é conhecida a existencia do typho endemico e de outra infecção affim, para a qual Pijper e Dau (15) propuseram a denominação de "tick-bite fever". Segundo estes auctores, o primeiro produz agglutininas para o *Proteus* X19 e X2 e a segunda, para estes typos e tambem para o *Proteus* Kingsbury (XK). As cobaias atacadas de ambas as infecções apresentam agglutininas para o typo Kinsgsbury e não para o X19 ou X2. Verificaram ainda o facto interessante de haver uma "inhibição temporaria", isto é, uma reacção que se manifesta somente após um repouso do soro durante alguns dias.

No que diz respeito ás formas de typho endemico já verificadas na America do Sul (Argentina e Chile), parece, segundo as observações de Kraus e collaboradores, que se comportam sorologicamente, com relação ao *Proteus* X19, como o typho endemico dos Estados Unidos e Mexico.

Finalmente, com referencia ao typho de São Paulo, a reacção de Weil-Felix, praticada por J. P. Fleury com o *Proteus* X19, mostrou-se inconstante, negativa em alguns casos, embora estes tivessem sido confirmados por outros meios, como se deprehende do citado trabalho (9) em que collaborou esse distincto collega (*). Este facto é de importancia e mostra que possivelmente o nosso typho apresenta mais de um typo sorologico, como acontece com o dos

---

(*) Em nota mais recente, levada á "Semana de Laboratorio" (janeiro de 1932), J. T. Piza apresentou os resultados de maior numero de reacções de Weil-Felix, com o *Proteus* X19, praticadas no Instituto Bacteriologico. Verifica-se, agora, que na maioria dos casos as reacções foram positivas com esse typo de *Proteus* X.

No nosso laboratorio, com J. Travassos, tivemos opportunidade de praticar a reacção com 4 soros, gentilmente fornecidos por L. Salles Gomes, empregando os typos de *Proteus* X2, X19 e XK (com as respectivas variantes O e H), que nos foram enviados por A. Felix.

Estados Malaios e, talvez, com a febre maculosa das Montanhas Rochosas, devendo, em todo caso, os estudos sorologicos ser continuados, usando-se tambem o *Proteus* XK (typo Kingsbury) para verificação da possivel existencia entre o *Proteus* XK (*).

No quadro annexo, resumimos as reacções sorologicas das varias formas de typho e infecções affins (Quadro I).

Estudadas assim, de um modo geral, as formas do typho e infecções proximas verificadas no continente americano e, rapidamente, as relações, principalmente sorologicas, que apresentam com as outras já conhecidas em differentes partes do mundo, passaremos a estudar mais particularmente o typho exanthematico de São Paulo.

Verificamos a reacção positiva com o *Proteus* X19 (e tambem com o *Proteus* XK em titulo menos elevado), sendo a agglutinação, com ambos, do typo O.

Estes estudos immunologicos sob este e sob outros aspectos (fixação do complemento, etc.) devem ser continuados em relação ao typho exanthematico de São Paulo. Ao mesmo tempo deverá ser tentado o isolamento de novos typos de *Proteus* dos doentes e animaes experimentalmente inoculados, segundo nos suggeriu o prof. A. Felix que, gentilmente, nos enviou dados sobre a technica que tem empregado para esse fim e que fornecemos tambem a collegas do Instituto Bacteriologico.

(*) Por extrema gentileza do prof. A. Felix, recebemos uma copia do original de seu ultimo trabalho, ainda inedito, "The rabbit as experimental animal in the study of the typhus of viruses", no qual figuram os resultados obtidos com soros de doentes e animaes inoculados com o virus, entre outros, do typho exanthematico de São Paulo. Aproveitando-nos ainda do atrazo desta publicação, é-nos grato assignalar as seguintes principaes conclusões desse eminente pesquisador na parte que nos interessa: "The interesting feature of these tests, however, is the occurrence of group agglutinins for type XK in the majority of the São Paulo sera. Sera from typhus patients from Europe, Australia and the United States of America never contain significant group agglutinins for XK. Agglutinins for XK are also absent from the serum patients belonging to Fletcher's "Group W" of tropical typhus, as is also seen from the reactions of the Malayan and Javan sera included. *The virus of the São Paulo endemic typhus is thus shown to represent still another antigenic variety; its main antigen is that of type X19 and it differs from other well known typhus viruses by its content of group antigen of type XK*". (O grypho é nosso e visa salientar a conclusão final).

No instituto Bacteriologico de *São Paulo*, J. Carvalho Lima conseguiu isolar um novo typo de Proteus X, cuja agglutinabilidade pelos soros especificos poude verificar. Este novo typo, enviado e ha pouco estudado tambem pelo prof. Felix que o denominou XL, corresponderia melhor ao typho exanthematico de São Paulo.

Registamos, com satisfacção, todos estes resultados experimentaes, por confirmarem a hypothese, suggerida numa de nossas primeiras notas, da diversidade sorologica do typho exanthematico de São Paulo.

QUADRO I

NOME	REGIÃO	VECTOR	Agglutinação com B. proteus X	
			Typo X19	Typo XK
Typho exanthematico (epidemico)	Novo e velho mundo	piolhos	+	—
Typho endemico (tobardillo)	Mexico	pulgas (1)	+	—
Typho endemico	Estados Unidos	pulgas (2)	+	—
Typho endemico	Australia	?	+	—
Typho endemico	Italia	?	+	0
Febre exanthematica marselhesa	Região mediterranea	pulgas (?)	÷	0
Febre botonosa	Região mediterranea	carrapatos (3)	÷	0
Typho tropical (typo W)	Malaia	?	+	—
Typho tropical (typo K)	Malaia	?	—	÷
Tsutsugamushi	Malaia e Sumatra	acarianos	—	+ (fraca)
Tsutsugamushi	Japão	acarianos	—	+ (fraca)
Typho exanthematico (febre petechial)	Norte da Argentina e Chile	piolhos (4)	+	0
Tick-bite fever	Sul da Africa	carrapatos (5)	÷	+
Febre maculosa das Montanhas Rochosas	Estados Unidos	carrapatos	÷	÷
Typho exanthematico de São Paulo	S. Paulo (Brasil)	carrapatos (?) (6)	÷	÷ (7)

+ = reacção positiva / — = reacção negativa / ÷ = reacção parcialmente positiva /0 = reacção não praticada/? = vector ainda desconhecido

(1) A transmissão experimental tem sido obtida tambem com piolhos, carrapatos e percevejos. De accordo com a verificação de Zinsser, o rato seria um depositario do virus. As pulgas são incriminadas em trabalhos recentes.

(2) Incriminadas em trabalhos recentes (Dyer, Rumreich e Badger).

(3) E' hoje geralmente responsabilizado o **Rhipicephalus sanguineus** (Burnet e Olmer, Durand e Consell, Brumpt, Blanc e Caminopetros, etc.).

(4) Segundo se deprehende dos trabalhos de Kraus e collaboradores, devendo-se, em todo caso, pesquisar outros possiveis vectores para as endemias reinantes em certos logares.

(5) Segundo Pijper e Dau, o titulo da reacção é baixo com o X19 e elevado com o XK.

(6) Obtivemos resultados positivos de transmissão da infecção experimental com certas especies de carrapatos. O **Amblyomma cajennense** deve ser incriminado (Monteiro e Fonseca).

(7) Segundo resultados mais recentemente publicados, é positiva com o X19 na maioria dos casos. O mesmo acontece com o XK, em titulo menos elevado, a se julgar pelos resultados de alguns soros que estudamos com J. Travassos e pelos obtidos por A. Felix, no Instituto Lister, de Londres.

3. - O typho exanthematico de São Paulo e seu aspecto epidemiologico.

No estudo da endemia em São Paulo e dos casos registados, ou, melhor, somente daquelles cujo diagnostico foi de qualquer maneira confirmado, servimo-nos das fichas clinicas organizadas e postas á nossa disposição pela Secção de Demographia do Serviço Sanitario do Estado, a cuja directoria aqui consignamos os nossos agradecimentos.

O primeiro caso nestas condições foi confirmado em 11.X.1929 e, até setembro de 1931, os casos perfaziam um total de 44. Numerosos outros casos foram suspeitados nesse periodo, porém tiveram outra confirmação diagnostica (a maioria como febre typhoide e gripe). Seu estudo clinico foi feito no Hospital de Isolamento da Capital, por J. T. Piza, e o diagnostico confirmado bacteriologicamente, quer por meio da reacção de Weil-Felix, feita por J. P. Fleury, quer pela inoculação em cobaias, realizada, com resultado positivo em alguns casos, por L. Salles Gomes, no Instituto Bacteriologico, ou, ainda, pelos exames histopathologicos realizados pelo prof. Rocha Lima e J. R. Meyer, no Instituto Biologico (*).

De accordo com o estudo que nos foi dado realizar das fichas destes casos, verificámos a seguinte frequencia nestes ultimos tres annos:

Em 1929 — 15; em 1930 — 20; em 1931 (até fins de agosto) — 9 (Total 44).

a) de accordo com a nacionalidade: brasileiros, 29; portugueses, 4; italiano, 1; austriaco, 1; lithuano, 1; espanhol, 1; russo, 1; não registados nas fichas, 6; b) quanto ao sexo: masculino, 17; feminino, 21; não registados, 6; c) quanto á côr: brancos, 30; pretos, 4; pardos, 4; não registados, 6; d) quanto á idade: até 10 annos, 8; de 11 a 20 annos, 13; de 21 a 30 annos, 13; de 31 a 40, 3; acima de 40, 1; não registados, 6; e) finalmente, com relação á zona de residencia: em zona urbana, 6; em zona suburbana, 33; em zona rural, 5 (proximidades da capital, incluindo 2 casos em municipio vizinho). Destes 44 casos falleceram 34, o que dá á infecção a mortalidade de 77,2%. Todos estes individuos eram residentes havia tempo no local onde contrahiram a molestia e, com rarissimas excepções, habitavam a mesma casa dentro do mês anterior. Poucos foram os casos em que foi possivel verificar-se a presença de piolhos na roupa e no corpo dos pacientes.

(*) Durante a revisão das primeiras provas deste trabalho, em outubro de 1932, chegou-nos ás mãos a publicação "Typho exanthematico de São Paulo" pelos drs. J. T. Piza, J. R. Meyer e L. Salles Gomes. O aspecto epidemiologico do mal é ahi estudado por J. T. Piza que tambem relata os principaes resultados de exames clinicos e de laboratorio effectuados, assim como as observações clinicas de 60 casos por elle acompanhados e estudados; a anatomia e histologia pathologicas dos casos necropsiados é estudada por J. R. Meyer e por L. Salles Gomes, a parte experimental, relativa á inoculação de material dos doentes em animaes de laboratorio e outras pesquisas correlatas.

Em investigações feitas com os prezados companheiros de trabalho, Flavio da Fonseca e Alcides Prado, em numerosas casas e zonas onde surgiram casos do mal, com o fim de pesquisar parasitas hematophagos, encontrámos com frequencia varios que poderiam ser incriminados, principalmente acarianos (mesmo nas camas dos moradores) e carrapatos que têm sido estudados no Instituto.

Seria possivel que algum representante da ordem dos acarianos fosse responsavel pela propagação, em São Paulo, do typho cujo virus poderia ter como depositario natural algum roedor por elle tambem parasitado, hypothese já emittida por Shelmire e Dove (16), quanto á transmissão do typho endemico da America do Norte por meio de um acariano, o *Liponyssus bacoti* Hirst. que é parasita do rato cinzento (*Epimys norvegicus*) e responsavel pela "rat mite dermatitis", cujo apparecimento tem coincidido com o do typho endemico no norte e éste do Estado de Texas.

Além desta possibilidade, foram estudadas outras experimentalmente: com varias especies de carrapatos, percevejos, pulgas, etc., estas ultimas agora incriminadas como responsaveis pela transmissão do typho endemico da America do Norte; além disto, pesquisámos, com F. da Fonseca, a possibilidade da existencia de depositarios do virus entre diversos roedores sylvestres (ratos, preás, lebres, etc.) e os resultados até agora obtidos, do mais alto interesse epidemiologico, constam de outros trabalhos.

Este resumo sobre os casos verificados e sua zona de expansão, assim como os possiveis meios de transmissão, dá ao typho exanthematico de São Paulo um caracter proprio, que o distingue do typho classico, caracter este que mais se accentuará pelo estudo do comportamento experimental do virus, como veremos nos capitulos seguintes.

CAPITULO II

Comportamento experimental do virus em relação aos pequenos animaes de laboratorio

No capitulo anterior fizemos considerações geraes sobre as differentes formas do "typhus", principalmente as observadas no continente americano, assim como sobre uma nova modalidade endemica que surgiu em São Paulo. Agora, passamos a relatar as nossas observações sobre o comportamento experimental do "virus" responsavel, representando este estudo, juntamente com outros (aspecto clinico, histopathologico, etc.), um dos elementos pelos quaes se poderá estabelecer a rigorosa identificação da infecção, quer justificando sua classi-

ficação entre algumas das formas de typho já descriptas, ou, com mais probabilidade, como modalidade nosologica á parte.

A primeira amostra do "virus" que estudámos, isolada de um dos doentes recolhidos ao Hospital de Isolamento de São Paulo, foi-nos cedida pelo distincto collega L. Salles Gomes, a quem renovamos aqui os nossos agradecimentos. Posteriormente, estudámos uma outra amostra, que isolámos de um novo doente recolhido ao mesmo hospital.

O estudo do comportamento do "virus" foi feito em relação a alguns animaes de laboratorio, especialmente a cobaia, sendo a inoculação praticada pelas vias sub-cutanea, peritoneal e venosa. A seguir, estudaremos o comportamento do virus relativamente a certos simios, pertencentes a tres generos differentes (*Macacus, Cebus* e *Alouatta*), e, por fim, o comportamento dos animaes de laboratorio, por inoculação por via intra-ocular, ou, melhor, na camara anterior do olho.

METHODO DE ESTUDO E MATERIAL

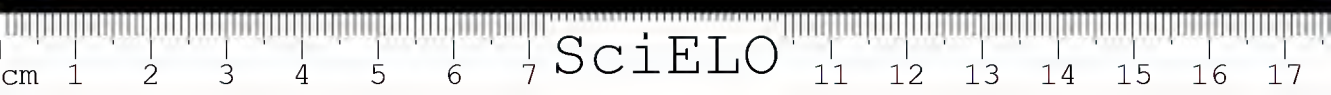
Para a inoculação por via peritoneal ou sub-cutanea, o "virus" era representado por sangue de um animal infectado, colhido em periodo de reacção febril, do terceiro ao quinto dia da reacção, geralmente no quarto, ou, então, por emulsão do cerebro de um animal nas mesmas condições e sacrificado geralmente no quarto dia de reacção febril.

O sangue era injectado "in natura", immediatamente após a colheita, citratado ou desfibrinado, e nas doses de 1 a 3 cc. Para o preparo da emulsão do cerebro infectante, tomavamos geralmente 1 gr. do orgam, colhido asepticamente e emulsionado em 10 cc. de agua physiologica, praticando a injecção na dose de 1 cc. (ás vezes, na dose de 2 cc.), correspondente a cerca de 0,1 gr. do orgam fresco.

Diversos animaes eram sacrificados durante a reacção febril para fins de novas passagens e conservação do "virus", deixando-se outros, afim de se acompanhar a evolução da infecção experimental.

Decorridos vinte a trinta dias, mas geralmente neste ultimo espaço de tempo, os que resistiam eram reinoculados com "virus" activo, para a prova de immunidade.

Muitos soffriam sangrias, em differentes periodos, para estudos posteriores sobre phenomenos de immunidade no decurso ou em consequencia da infecção.

Os animaes sacrificados ou mortos eram necropsiados e observadas as principaes alterações anatomicas, sendo colhido material para exame histopathologico (usados como fixadores o formol a 10%, o liquido de Zenker e o liquido de Regaud), assim como para a pesquisa de "Rickettsias" em esfregaços.

A temperatura rectal de todos os animaes era tomada diariamente, ás mesmas horas (entre 12 e 13 horas). Verificámos em nossas cobaias uma variação individual da media normal da temperatura, devendo-se, por isto, fazer sua determinação approximada, para o que se terá uma base pela temperatura do dia da inoculação, sendo que ás vezes foi tambem tomada a da vespera. Nas cobaias em que esta temperatura era comprehendida entre 38°,5 a 39°,5, só foram consideradas como reacção as temperaturas acima de 40°; nos animaes cuja temperatura inicial estava entre 37°.5 a 38°,5 a reacção era baseada em temperatura acima de 39°,5.

1. - Resultados da experimentação.

A) *Marcha da infecção na cobaia.* - O quadro annexo resume os resultados do comportamento experimental do "virus" com relação á cobaia, mostrando-se elle bastante pathogenico, pois provoca nesse animal uma reacção febril caracteristica, após certo periodo de incubação, terminando a infecção quasi sempre pela morte (Quadro II).

Muitas cobaias, além das designadas no referido quadro, foram já inoculadas, num total de mais de 800 (*), cuja relação registar-se-á conjunctamente com experiencias a serem descriptas neste e em outros trabalhos. As indicadas agora, porém, em numero superior a 100, parecem sufficientes para se julgar do comportamento experimental do "virus" do typho exanthematico de São Paulo em relação a essa especie.

O exame do quadro annexo indica que, inoculando-se o virus por via subcutanea, o periodo de incubação da infecção é um pouco mais longo do que por via peritoneal e que ella se processa com maior regularidade e constancia empregando-se como material infectante a emulsão de cerebro.

Tomando-se em consideração somente os animaes que apresentaram reacção febril caracteristica, observa-se que, por via peritoneal, o periodo de incubação foi de 3 a 4 dias, em media, tendo-se observado incubação de até 48 horas e raramente de 6 dias (apenas em 2 casos ultrapassou 10 dias). Nas mesmas condições e só considerando os animaes que tiveram evolução natural da infecção, verificou-se que o periodo de reacção febril variou de 3 a 8 dias, tendo apenas uma vez perdurado 12 dias. No fim deste prazo os animaes geralmente morrem em menos de 24 horas, cahindo-lhes a temperatura abaixo do normal; ás vezes observa-se nova ascensão, menos accentuada, seguida de nova baixa thermica e da morte. Quando o restabelecimento do animal se dá, a temperatura volta á media normal e, neste caso, elle se mostra immunizado, não reagindo a uma segunda inoculação do virus activo. Esta immuni-

(*) Este numero comprehende o total das cobaias inoculadas até junho de 1932.

QUADRO II

Comportamento experimental do "virus" do typho exanthematico de São Paulo (amostras L e W) em relação á cobaia (***)

Cobaia N.º	Data da inoculação	Virus inoculado	Via	Dias de incubação	Dias de reacção febril	Resultado da inoculação	Prova de immunidade e observações
7	10-1-31	Sangue cob. 1 (*)	p.	4	5	† noite 20/21-1-31	Virus L. Apresentou reacção escrotal
8	10-1-31	Emulsão cer. cob. 1	p.	4	1	† noite 20/21-1-31	Apresentou reacção escrotal ligeira.
9	11-1-31	S. cob. 3 (3 cc.) (**)	p.	4	1	Sacrificada em 22-1-31	
10	14-1-31	Em. cer. cob. 3	p.	2	8	† manhã de 4-II-31	Apresentou reacção escrotal intensa, com petechia hemorrhagica nos ultimos dias.
11	14-1-31	Em. test. cob. 3	p.	1	6	† 12 h. de 22-1-31	Apresentou reacção escrotal.
13	21-1-31	Em. cer. cob. 7	p.	4	8	† noite 2/3-II-31	
14	21-1-31	Em. cer. cob. 8	p.	4	7	† noite 2/3-II-31	Apresentou reacção escrotal.
17	22-1-31	Em. cer. cob. 11	p.	3	7	Reacção febril intermittente. Resistiu á infecção.	Em 25-II-31 esta cobaia (femea) foi reinoculada com o "virus" (em. cer. do **rhesus** IV): não apresentou reacção febril, mostrando-se immunizada.
18	22-1-31	S. cob. 9 (2 cc.)	p.	11	1	Resistiu.	Teve reacção escrotal durante a reacção febril. Em 25-II-31 foi reinoculada com "virus" (em. cer. **rhesus** IV), não apresentando reacção febril, mostrando-se immunizada.
19	22-1-31	S. cob. 10 (2 cc.)	p.	3	5	Sacrificada em 31-1-31	

20	22 - I - 31	Em. cer. cob. 9	p.	3	7	† 11 h. de 2 - II - 31	Apresentou reacção escrotal ligeira.
21	27 - I - 31	S. cob. 14 (t. 40°,2)	p.	5	5	† noite de 7/8 - II - 31	Apresentou reacção escrotal.
22	29 - I - 31	S. cob. 19 (7.° dia, t. 40°,8)	p.	1	1	Não apresentou reacção febril.	Em 25 - II - 31 foi reinoculada com o "virus" (em. cer. rhesus IV), tendo tido infecção característica; após 4 dias de incubação, febre durante 4 dias e † na noite de 5/6 - III - 31.
23	31 - I - 31	S. cob. 19 (1 cc. colhido necrop.)	p.	2	7	Resistiu á infecção, tendo tido um 2.° período de reacção febril.	Em 25 - II - 31 foi reinoculada com o "virus" (em. cer. rhesus IV), tendo tido reacção febril após longa incubação (26 dias), reacção que poderá ser de causa diversa. † na manhã de 28 - III - 31.
24	31 - I - 31	Em. cer. cob. 19	p.	2	4	Sacrificada em 6 - II - 31	Apresentou reacção escrotal ligeira.
27	3 - II - 31	Em. cer. e supra-renal cob. 11	p.	1	9	Reacção com uma intermittencia para a normal. † noite de 22/23 - II - 31.	
28	3 - II - 31	Em. cer. e supra-renal cob. 13	p.	2	7	Resistiu.	Em 20 - III - 31 foi reinoculada com o virus (em. cer. cob. 113). Não apresentou reacção febril. Amanheceu morta em 26 - III - 31, verificando-se derrame peritoneal com hemorrhagia devida á ruptura do figado.
31	5 - II - 31	S. cob. 24 (1,5 cc.)	p.	3	5	Reacção febril com uma intermittencia. Resistiu.	Em 28 - II - 31 foi reinoculada com o virus (em. cer. cob. 59) na camara anterior do olho. Observou-se ligeira reacção ocular, porém sem reacção febril. Esteve em observação até 13-IV-31.
35	7 - II - 31	Em. cer. cob. 24	p.	2	5	† noite 14/15 - II - 31.	
38	10 - II - 31	S. rhesus I (1 cc., 5.° dia, t. 41°,1)	p.	5	3	† manhã de 19 - II - 31.	

Cobaia N.º	Data da inoculação	Virus inoculado	Via	Dias de incubação	Dias de reacção febril	Resultado da inoculação	Prova de immunidade e observações
11	12 - 11 - 31	Em. cer. **rhesus** I	p.	1	2	† noite 18/19 - II - 31	Morte precipitada accidentalmente, amanhecendo presa entre as grades da gaiola.
51	16 - 11 - 31	S. **rhesus** II (2 cc.) 6.º dia, t. 40º,5	p.	2	3	† noite 22/23 - II - 31	
52	17 - 11 - 31	Em. cer. e supra-renal **rhesus** II	p.	6	3	† noite 26/27 - II - 31	
57	19 - 11 - 31	Em. cer. cob. 38	p.	1	5	† noite 1/2 - III - 31	
63	21 - 11 - 31	S. **rhesus** III (1 cc. colhido necrop.)	p.	12	12	Resistiu.	Em 25 - III - 31 foi reinoculada com o virus (em. cer. cob. 129). Não apresentou reacção febril, mostrando-se immunizada. Observada até 28 - IV - 31.
81	25 - 11 - 31	Em. cer. **rhesus** IV	p.	1	2	† noite 3/4 - III - 31	O cerebro inoculado esteve conservado no frigo desde a vespera. A morte foi precipitada, accidentalmente, visto a cobaia ter amanhecido imprensada na gaiola.
82	25 - 11 - 31	S. citratado do **rhesus** V (1cc., 1.º dia, t. 40º,8)	p.	3	2	† manhã de 1 - III - 31	
84	27 - 11 - 31	Em. cer. **rhesus** V	p.	1	6	Sacrificada em 9 - III - 31	
88	27 - 11 - 31	Em. cer. cob. 52	p.	—	—	Não apresentou reacção febril.	Amanheceu morta em 8 - III - 31, verificando-se, á necropsia, um derrame sero-hemorrhagico na cavidade peritoneal.
91	2 - III - 31	Em. cer. cob. 57	p.	3	-	† noite 11/12 - III - 31	Apresentou reacção escrotal ligeira.

98	4 - III - 31	Em. cer. cob. 82	p.	—	—	Não apresentou reacção febril.	Em 8 - IV - 31 foi reinoculada com o virus (em. cer. cob. 152), tendo tido reacção caracteristica após incubação de 21 dias. Foi sacrificada em 16-IV-31.
99	1 - III - 31	Em. cer. cob. 81	p.	2	6	Sacrificada em 12-III-31	
110	10 - III - 31	Em. cer. cob. 81	p.	2	4	Sacrificada em 17-III-31	
113	12 - III - 31	Em. cer. cob. 94	p.	2	5	Sacrificada em 20-III-31	
114	12 - III - 31	Em. cer. cob. 99	p.	2	3	† noite 19/20-III-31	
124	16 - III - 31	S. cob. 98 (1 cc.)	p.	—	—	Não apresentou reacção febril.	A morte deu-se ás 13 horas de 23-III-31, provavelmente por causa intercorrente. Pela necropsia observou-se congestão pulmonar e hepatica.
125	17 - III - 31	Em. cer. cob. 110	p.	—	—	Não apresentou reacção febril.	Amanheceu morta em 23 - III - 31, observando-se pela necropsia abundante derrame sero-hemorrhagico no peritoneo.
128	20 - III - 31	S. cob. 113 (2 cc.), 8.° dia, t. 40°	p.	4	8	† 12 h. de 2 - IV - 31	
129	20 - III - 31	Em. cer. cob. 113	p.	3	2	Sacrificada em 25-III-31	
132	23 - III - 31	Em. cer.cob. 124	p.	—	—	Não apresentou reacção febril. Resistiu.	Em 22-IV-31 foi reinoculada com o virus (em. cer. cob. 169), tendo tido reacção febril caracteristica após incubação de 2 dias. † noite 3/4 - V - 31.
135	25 - III - 31	Em. cer. cob. 129	p.	2	5	Sacrificada em 1-IV-31	
141	25 - III - 31	Em. cer. cob. 129	sb. ct	4	4	Sacrificada em 2-IV-31	
142	27 - III - 31	S. cob. 128 (2 cc.) 7.° dia, t. 40°,6	p.	9	5	Resistiu á infecção.	Em 30 - IV - 31 foi reinoculada com o virus (em. cer. cob. 180), não apresentando reacção febril e mostrando-se immunizada. Suspensa de observação em 30 - V - 31.

Cobaia N.º	Data da inoculação	Virus inoculado	Via	Dias de incubação	Dias de reacção febril	Resultado da inoculação	Prova de immunidade e observações
152	1 - IV - 31	Em. cer. cob. 135	p.	3	4	Sacrificada em 8-IV-31	
155	2 - IV - 31	Em. cer. cob. 111	sb. ct.	3	5	Sacrificada em 10-IV-31	
156	6 - IV - 31	S. cob. 112 (2 cc.) colhido no 10.º dia, ainda sem reacção febril.	p.	—	—	Não apresentou reacção febril. Resistiu.	Em 2-V-31 foi reinoculada com o virus (em. cer. cob. 185), apresentando reacção febril caracteristica e morrendo ás 12 h. de 13-V-31.
161	8 - IV - 31	Em. cer. cob. 152	p	—	—	Não apresentou reacção febril.	Sacrificada na manhã de 14-IV-31. A' necropsia encontrou-se abundante derramo peritoneal sero-sanguinolento Nas cellulas mesotheliaes da parede peritoneal foram verificadas abundantes rickettsias.
167	10 - IV - 31	Em. cer. cob. 155	sb. ct.	4	3	Sacrificada em 17-IV-31	
169	13 - IV - 31	Em. cer. cob. 123	p.	3	5	† 12 h. de 22-IV-31	A cob. 123 estava em outra serie de experiencias (sobre transmissibilidade de virus). Reinoculada com o virus da cob. 152 em 8-IV-31; após 3 dias de incubação iniciou-se a reacção febril (41º), sendo sacrificada em 13-IV-31.
170	11 - IV - 31	Exsd. perit. cob. 161 (lec.)	p.	2	5	Sacrificada em 21-IV-31	
171	14 - IV - 31	Em. cer. cob. 161	p.	3	5	† 8 h. 23 - IV - 31	
172	16 - IV - 31	Em. cer. cob. 98	p.	3	1	† 12 h. de 25-IV-31	O virus inoculado proviera da cob. 152.
171	17 - IV - 31	Em. cer. cob. 167	sb. ct	4	3	Sacrificada em 21-IV-31	
175	18 - IV - 31	Em. cer. cob. 112	p.	1	5	Sacrificada em 27-IV-31	A cob. 112 estava em experiencia de transmissibilidade e foi reinoculada em 8-IV-31 com o virus da cob. 152, sendo sacrificada em 18-IV-31, após reacção caracteristica (4 dias de incubação e 6 de reacção febril).

177	21 - IV - 31	Em. cer. cob. 170	p.	4	2	† noite 28/29-IV-31	
180	22 - IV - 31	Em. cer. cob. 169	p.	5	3	Sacrificada em 30-IV-31	
182	23 - IV - 31	Em. cer. cob. 171	p.	2	1	Sacrificada em 29-IV-31	
185	21 - IV - 31	Em. cer. cob. 174	sb. cl.	3	1	Sacrificada em 2-V-31	
187	27 - IV - 31	Em. cer. cob. 175	p.	3	3	† manhã de 6-V-31	
198	29 - IV - 31	Em. cer. cob. 182	p.	3	4	† noite de 7/8-V-31	
200	30 - IV - 31	Em. cer. cob. 180	p.	—	—	Não apresentou reacção febril. Resistiu.	† por causa diversa em 22-V-31.
201	2 - V - 31	Em. cer. cob. 185	sb. cl.	5	5	Sacrificada em 12-V-31	
202	4 - V - 31	Em. cer. cob. 193	p.	2	5	Sacrificada em 11-V-31	A cobaia 193, de outra serie de experiencias, foi inoculada com o virus da cobaia 182.
203	6 - V - 31	Em. cer. cob. 187	p.	4	1	Sacrificada em 14-V-31	
205	6 - V - 31	Em. cer. cob. 194	p.	2	1	† noite de 13/14-V-31	Apresentou reacção escrotal. A cobaia 194, de outra serie de experiencias, foi inoculada com o virus da cobaia 182.
209	8 - V - 31	Em. cer. cob. 198	p.	1	4	Sacrificada em 16-V-31	
210	8 - V - 31	Em. cer. cob. 197	p.	2	5	† noite de 21/25-V-31	A cob. 197, de outra serie de experiencias, foi inoculada com o virus da cob 185.
212	11 - V - 31	Em. cer. cob. 202	p.	6	2	† noite 24/25-V-31	
213	12 - V - 31	Em. cer. cob. 201	sb. cl.	6	4	Sacrificada em 22-V-31	Infecção attenuada
214	12 - V - 31	Em. tunica vag. test. cob. 165 (com inflam. escr.)	p.	1	4	† accidental (?) noite 17/18-V-31	
221	14 - V - 31	Em. cer. cob. 203	p.	3	3	Sacrificada em 21-V-31	

Cobaia N.º	Data da inoculação	Virus inoculado	Via	Dias de incubação	Dias de reacção febril	Resultado da inoculação	Prova de immunidade e observações
225	16 - V - 31	Em. cer. cob. 209	p.	2	1	† manhã de 21-V-31	Constatou-se derrame hemorrhagico na cavidade peritoneal.
226	19 - V - 31	S. cob. 221 (1 cc., 3.º dia)	p.	1	1	† noite 21/25-V-31	Constatou-se derrame hemorrhagico na cavidade abdominal.
228	19 - V - 31	Em. cer. cob. 181 (v. cob. 203)	p.	2	3	Sacrificada em 26-V-31	
230	21 - V - 31	Em. cer. cob. 221	p.	2	2	Não apres. reac. febril, acima de 40º; muito mal, foi sacrificada na manhã de 26-V-31	O peritoneo foi lavado, sendo o liquido utilizado, após tratamento especial, em experiencias de vaccinação.
231	22 - V - 31	Em. cer. cob. 213	sb. ct.	5	3	Resistiu.	Em 10-VI-31 foi reinoculada com virus (emul. cer. cob. 239), não tendo tido reacção e mostrando-se immunizada.
233	26 - V - 31	Em. cer. cob. 228	p.	—	—	Não apresentou reac. febril.	Em 10-VI-31 foi reinoculada com o virus (em. cer. cob. 239), tendo tido reacção febril caracteristica (4 dias, após incubação de 3 dias). † natural em 21-VI-31.
234	27 - V - 31	Em. cer. Mac. rhesus IX	p.	4	3	Sacrificada em 3-VI-31	O Mac. rhesus IX havia sido inoculado com em. cer. cob. 221 em 21-V-31.
235	27 - V - 31	Em. cer. Mac. rhesus IX	p.	4	2	† manhã de 4-VI-31	Pela necropsia, praticada immediatamente após a morte, observou-se, alem do augmento do baço, derrame sero-hemorrhagico nas cavidades peritoneal e pleural.
239	3 - VI - 31	Em. cer. cob. 234	p.	4	3	Sacrificada na tarde de 10-VI-31	

212	10 - VI - 31	Em. cer. **Cebus ap. 1**	p.	2	6	Sacrificada em 18-VI-31	O **Cebus apella** havia sido inoculado com emul. cer. da cob. 231 em 3-VI-31.
233	10 - VI - 31	Em. cer. **Cebus ap. 1**	sb. ct.	4	1	Sacrificada em 18-VI-31	Esta cobaia, assim como a anterior, pertenciam á serie em experiencias sobre vaccinação com liquido de lavagem peritoneal.
241	10 - VI - 31	Em. cer. cob. 239	p.	1	3	Sacrificada em 17-VI-31	Esta cobaia apresentou nos 2 ultimos dias reacção escrotal (edema e ligeiro augmento). Em 16-VI-31 foi picada por carrapatos (**Ornithodorus rostratus**).
246	16 - VI - 31	S. **Alauatta ca. 1**	p.	1	5	† 13 h. de 23-VI-31	O **Alauatta caraya**, bugio, havia sido inoculado com emulsão de cerebro da cobaia 239 em 10-VI-31.
249	17 - VI - 31	Em. cer. **Alauatta ca. 1**	p.	2	1	† noite 23/24-VI-31	
250	17 - VI - 31	Em. cer. **Alauatta ca. 1**	sb. ct.	2	5	† 12 h. de 25-VI-31	
251	17 - VI - 31	Em. cer. cob. 244	p.	—	—	Não apresentou reacção febril. † noite de 21/22 - VI - 31.	A temperatura attingiu 39°,8. Observou-se á necropsia ligeiro exsudato peritoneal. A pesquisa de rickettsias nas cellulas mesotheliaes da parede peritoneal foi positiva.
251	18 - VI - 31	Em. cer. cob. 242	p.	3	4	Sacrificada em 25-VI-31	
255	18 - VI - 31	Em. cer. cob. 243	p.	5	3	Sacrificada em 26-VI-31	
259	18 - VI - 31	Em. cer. cob. 243	p.	—	—	Não apresentou reacção febril.	Foi sacrificada para pesquisa de rickettsias em 26-VI-31, juntamente com a cobaia 255, que teve reacção febril caracteristica.
260	18 - VI - 31	Em. cer. cob. 243	p.	3	1	Sacrificada em 22-VI-31	Foi sacrificada para pesquisa de rickettsias no 1.º dia da reacção febril. O peritoneo foi lavado, para experiencias de vaccinação.

Cobaia N.°	Data da inoculação	Virus inoculado	Via	Dias de incubação	Dias de reacção febril	Resultado da inoculação	Prova de immunidade e observações
263	22 - VI - 31	Em. cer. cob. 260 (1.° dia de febre)	p.	3	5	† noite 1/2-VII-31	Verificou-se que no 1.° dia de febre (1.° da inoculação) o virus já se encontra no cerebro.
265	23 - VI - 31	Em. cer. cob. 246	p.	1	6	† noite 1/2-VII-31	Apresentou reacção escrotal.
267	23 - VI - 31	Em. cer. cob. 249	p.	3	1	Sacrificada em 1-VII-31	
271	25 - VI - 31	Em. cer. cob. 254	p.	5	3	† noite de 3/4-VII-31	
272	25 - VI - 31	S. cob. 254 (lec, colhido no 7.° dia, temp. 40°,5)	p.	1	5	Sacrificada em 1-VII-31	Apresentou ligeira reacção escrotal.
277	1 - VII - 31	Em. cer. cob. 267	p.	5	4	† ás 15 h. de 11-VII-31	Ligeira reacção escrotal.
278	1 - VII - 31	Em. cer. cob. 272	p.	5	4	Sacrificada em 10-VII-31	
282	2 - VII - 31	Em. cer. cob. 265	p.	1	1	Resistiu á infecção	Ao ser sangrada, em 30-VII-31, morreu em consequencia do traumatismo.
283	2 - VII - 31	Em. cer. cob. 262	p.	1	2	† manhã de 9-VII-31	A cobaia 262 havia sido inoculada com o liquido de lavagem peritoneal da cobaia 260, no 1.° dia de febre. Teve reacção febril caracteristica durante 7 dias, após 3 de incubação, sendo sacrificada em 2-VII-31.
284	1 - VII - 31	Em. cer. cob. 271	p.	2	1	† noite 11/12-VII-31	Apresentou ligeira reacção escrotal.
294	9 - VII - 31	Em. cer. cob. 283	p.	2	1	† manhã 16-VII-31	
295	10 - VII - 31	Em. cer. cob. 278	p	3	1	Sacrificada em 17-VII-31	
296	11 - VII - 31	Em. cer. cob. 277	p.	3	1	Sacrificada em 18-VII-31	

305	17 - VII - 31	Em. cer. cob. 295	p.	2	1	Sacrificada em 24-VII-31	
307	18 - VII - 31	Em. cer. cob. 296	p.	3	3	Sacrificada em 21-VII-31	
308	18 - VII - 31	Em. cer. cob. 296	p.	3	1	† noite 25/26-VII-31	
311	21 - VII - 31	Em. cer. cob. 305	p.	3	3	Sacrificada em 30-VII-31	
312	21 - VII - 31	S. dil. cob. 307 (3cc., colhido no 6.º dia da inocul. e 3.º da febre).	p.	2	3	† 12 h. de 30-VII-31	
314	21 - VII - 31	S. dil. cob. 307 (idem)	p.	3	1	† 11 h. de 1-VIII-31	
315	21 - VII - 31	Em. cer. cob. 307	p	4	2	† 12 h. de 30-VII-31	
317	30 - VII - 31	Em. cer. cob. 311	p.	3	5	Sacrificada em 7-VIII-31	
318	30 - VII - 31	Em. cer. cob. 315	p.	1	1	Sacrificada em 7-VIII-31	
319	1 - VIII - 31	Em. cer. cob. 311	p.	—	—	Não apresentou reação febril.	† pela manhã de 8-VIII-31.
320	7 - VIII - 31	Em. cer. cob. 317	p.	1	1	Sacrificada em 13-VIII-31	
321	7 - VIII - 31	Em. cer. cob. 318	p	2	1	Sacrificada em 13-VIII-31	
322	8 - VIII - 31	Em. cer. cob. 319 (sem reação febril)	p.	2	1	Sacrificada em 11-VIII-31	
323	13 - VIII-31	Em. cer. cob. 320	p.	1	1	Sacrificada em 21-VIII-31	
324	13 - VIII-31	Em. cer. cob. 321	p.	3	1	Sacrificada em 20-VIII-31	
325	14 - VIII-31	Em. cer. cob. 322	p.	3	1	Sacrificada em 21-VIII-31	

Cobaia N.°	Data da inoculação	Virus inoculado	Via	Dias de incubação	Dias de reacção febril	Resultado da inoculação	Prova de immunidade e observações
							Virus W.
330	22-VIII-31	S. citr. (3cc.) da doente Wanda, do Hospital de Isolamento de São Paulo	p.	2	2	Sacrificada em 26-VIII-31	
331	22-VIII-31	Idem	p.	1	3	Sacrificada em 29-VIII-31	
336	26-VIII-31	S. cob. 330 (3 cc.)	p.	2	4	Sacrificada em 1-IX-31	
338	26-VIII-31	Em. rasp. perit. cob. 330	p.	2	5	Sacrificada em 2-IX-31	
342	29-VIII-31	Em rasp. perit. cob. 337	p.	2	5	Sacrificada em 5-IX-31	A cob. 337 foi sacrificada no 3.° dia, antes da reacção febril.
346	1 - IX - 31	Em. cer. cob. 336	p.	3	8	† 13 h. de 16-IX-31	
353	2 - IX - 31	Em cer. cob. 338	p.	2	4	Sacrificada em 8-IX-31	
359	5 - IX - 31	Em. cer. cob. 339	p.	3	4	† noite de 13/14-IX-31	A cob. 339 foi inoculada na c.a.o. com humor aquoso do cob. 332, infectada por esta via.
361	8 - IX - 31	Em. cer. cob. 353	p.	3	4	Sacrificada em 15-IX-31	
365	8 - IX - 31	Em. cer. cob. 347	p.	4	5	† noite de 17/18-IX-31	A cob. 347 foi inocul. com em. cer. do Mac. rh. XI, infectado, por sua vez, com o sangue da doente.

383	15 - IX - 31	Em. cer. cob. 364	p.	5	4	Sacrificada em 21-IX-31	
481	31 - X - 31	Em. cer. cob. 471	p.	3	4	Sacrificada em 7-XI-31	
500	7 - XI - 31	Em. cer. cob. 481	p.	2	4	Sacrificada em 13-XI-31	
563	29 - XI - 31	Em. cer. cob. 554	p.	2	5	Sacrificada em 5-I-32	
564	30 - XII - 31	Em. cer. cob. 555	p.	3	3	Sacrificada em 6-I-32	

(*) A cobaia 1 foi inoculada em 3-1-31 com o virus original (L), remettido pelo dr. L. Salles Gomes. A inoculação foi feita no peritoneo. Observou-se, desde o 3.º dia, augmento de volume e inflammação do escroto. Foi sacrificada no 7.º dia após a inoculação, em 10-I-31.

(**) A cobaia 3 foi tambem inoculada com o mesmo material em 3-1-31. Após 11 dias, a temperatura subiu acima de 40º, sendo o animal sacrificado. Apresentou tambem reacção escrotal (augmento de volume e inflammação) intensa, com petechias e depois placas hemorrhagicas no escroto.

(***) As cobaias registadas e inoculadas com os virus L (1.ª serie) e W (2.ª serie) são sufficientes para mostrar a evolução da infecção experimental nesse animal, sendo desnecessario o registo de todas as inoculadas, em passagens e experiencias diversas. Em Junho de 1932, estes virus se encontravam, respectivamente, na 91.ª e 45.ª gerações.

Abreviaturas usadas no quadro: S = sangue; Em. cer. = emulsão de cerebro; p. = peritoneal; sb. ct. = sub-cutaneo;
Em. test. = emulsão de testiculo; Em. rasp. perit. = emulsão de raspagem peritoneal;
† = morte do animal; c. a. c. = camara anterior do olho.

dade pode persistir na cobaia durante 3 meses, não estando ainda verificado o seu praxo maximo (*). As cobaias apresentam, muitas vezes, nos ultimos dias e após a morte, phenomenos hemorrhagicos cutaneos, mais accentuados nas extremidades dos membros, que se mostram então arroxeados.

A morte como consequencia da infecção, considerando-se apenas os animaes em que a evolução se processou naturalmente, dá-se em cerca de 70% das cobaias inoculadas.

Pelo quadro II verifica-se ainda a extrema regularidade da infecção quando utilizada como "virus" a emulsão do cerebro de um animal infectado e sacrificado em periodo propicio. Mesmo no primeiro dia de febre (cob. 260) e quarto da inoculação, o cerebro já se mostrava infectante. Apenas em 8 casos em que se applicou essa emulsão, não se verificou evolução caracteristica da doença experimental e, destes, somente em 3 animaes (cobs. ns. 98, 233 e 132, a ultima não devendo ser considerada, em virtude de ter ficado evidente que o material inoculado era avirulento), a infecção não se processou, tanto que os mesmos depois não se mostraram immunizados. Nos outros cinco casos (cobs. ns. 88, 125, 161, 251 e 259) a infecção se processou provavelmente de um modo atypico sem reacção febril, mas comprovada por passagens e observação de microorganismos semelhantes a "Rickettsias" nas cellulas endotheliaes da parede peritoneal. A verificação foi completa, neste sentido, quanto á cobaia n.º 161.

Esta forma atypica da infecção, que se observa em cobaias sob determinadas condições e na qual com maior facilidade se põe em evidencia a presença da "Rickettsia" que descrevemos nas cellulas mesotheliaes do peritoneo das cobaias com infecção caracteristica (17), será estudada detalhadamente na 2.ª parte deste trabalho.

Ainda pelo estudo do quadro II, verifica-se que o sangue, mesmo extrahido de animal com reacção febril, ás vezes se mostra menos virulento ou, então, que, em certas occasiões, nelle existe o "virus" em menor concentração, sendo necessarias, para que a infecção se processe, doses mais elevadas (até 4 cc.); assim mesmo, observa-se muitas vezes evolução mais benigna, isto é, com periodo de incubação mais longo, reacção febril por poucos dias e sobrevivencia do animal, que se mostra, em todo caso, immunizado a uma segunda inoculação virulenta.

Isto se deve explicar pelo facto de não ser constante a quantidade do "virus" na corrente circulatoria, mesmo durante o periodo de reacção febril, ou, então que, depois de certo tempo, o elemento virulento soffra a acção de

---

(*) Por algumas experiencias feitas com maior prazo, verificámos que a immunidade não é permanente, diminuindo e desapparecendo, a cobaia reagindo, então, em relação a nova inoculação virulenta.

anticorpos que elle proprio tenha provocado, dando-se, então, a sua concentração nos organs, principalmente no cerebro.

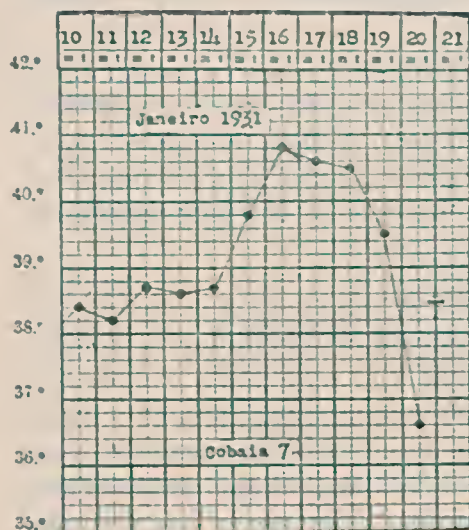
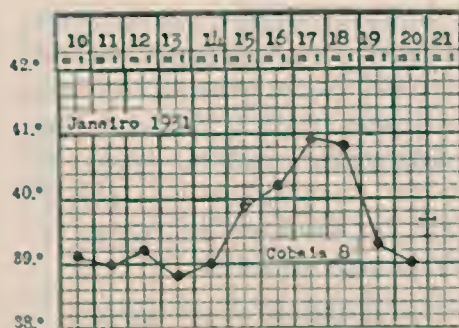
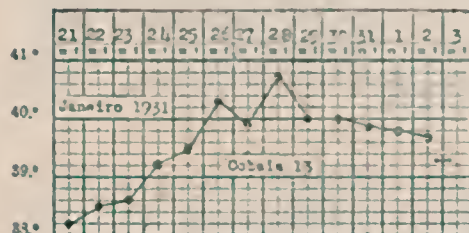
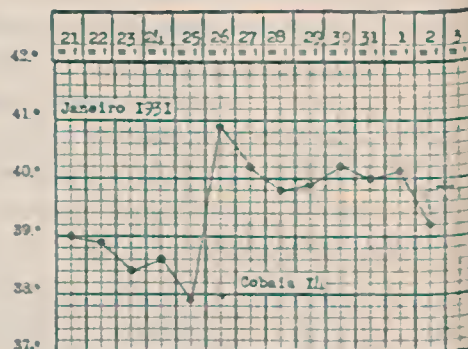
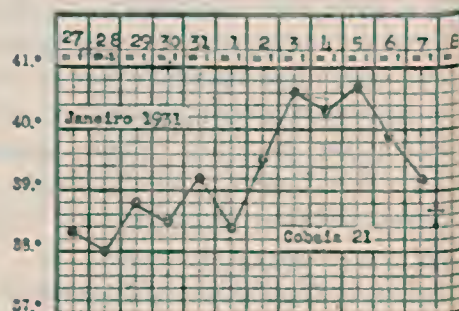
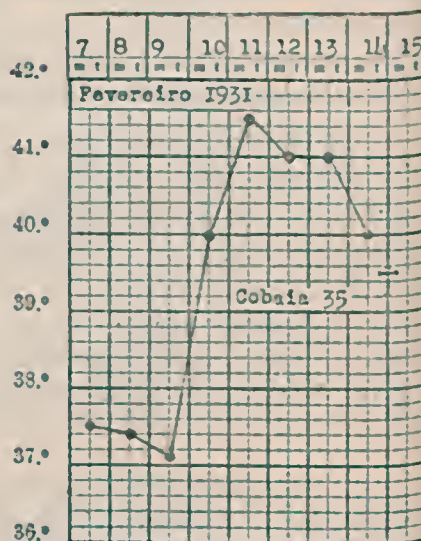
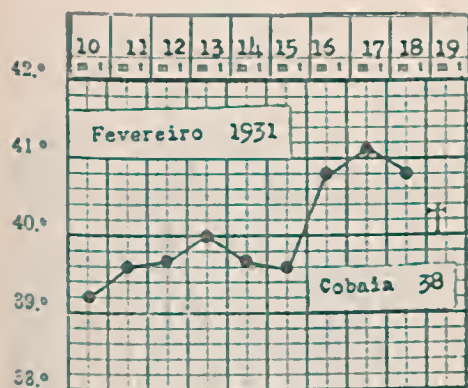
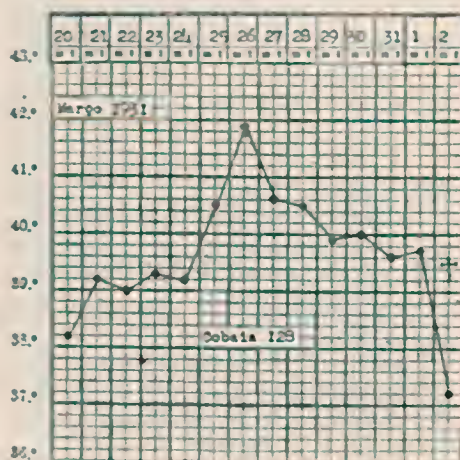
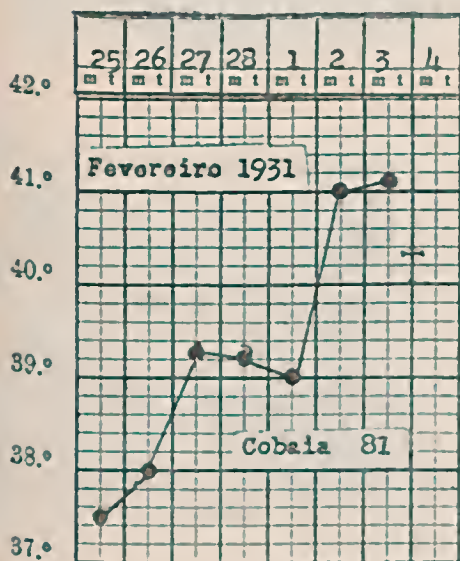
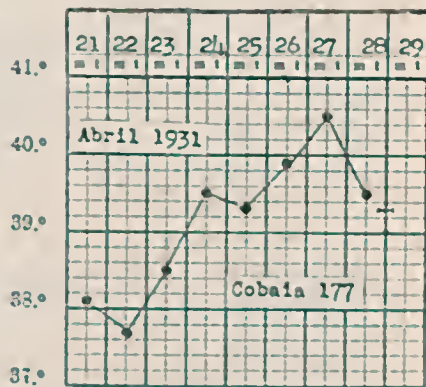
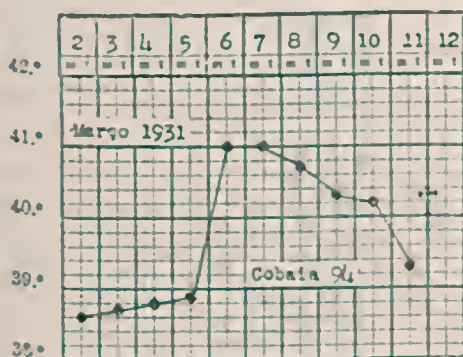
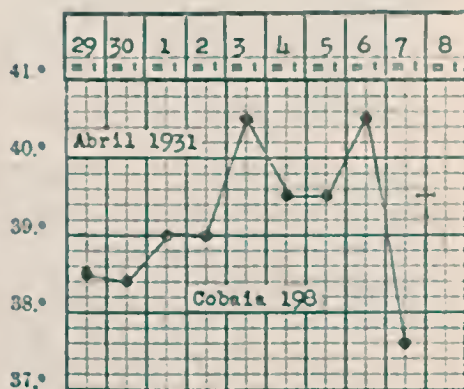
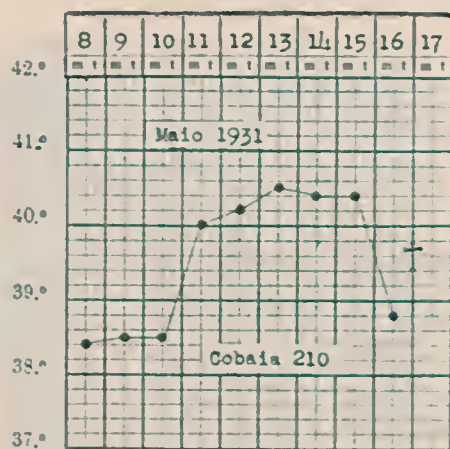
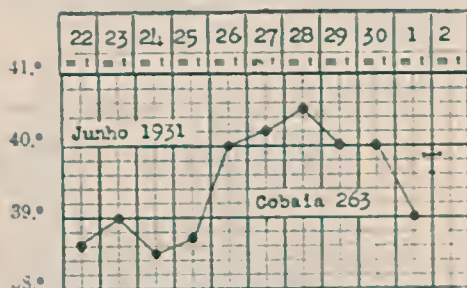
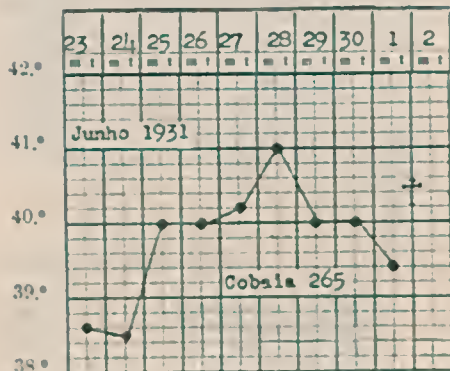
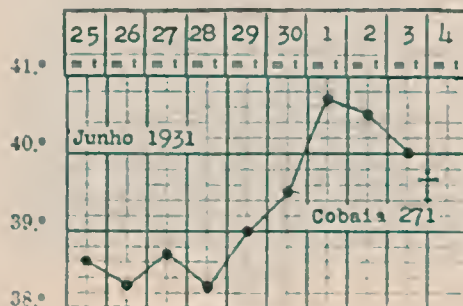
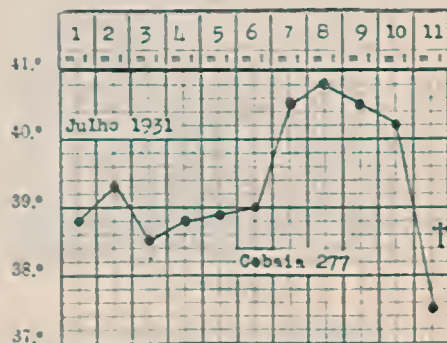
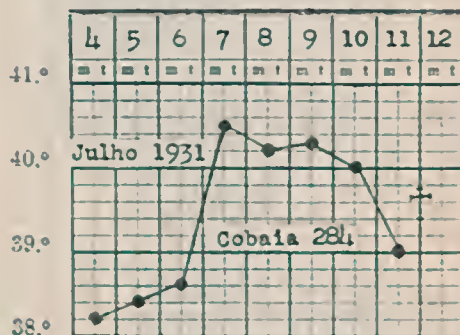
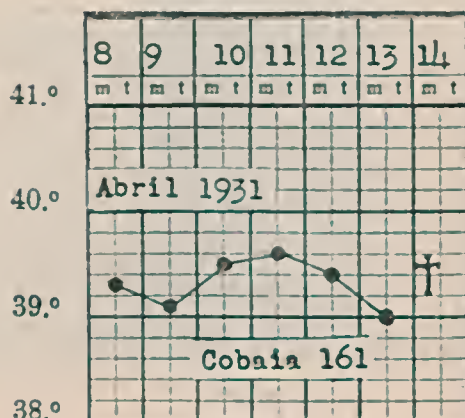
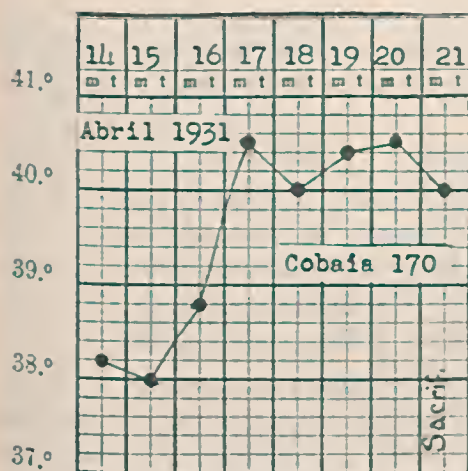
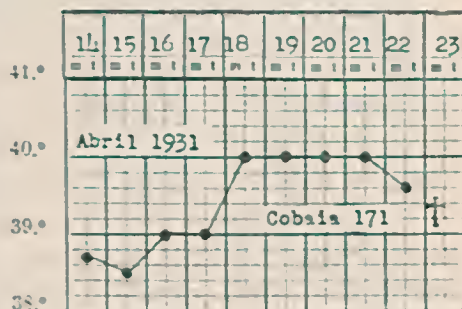
Quando se emprega como via de introducção do "virus" a camara anterior do olho de certos animaes (coelho, cobaia, macaco), consegue-se provocar a infecção com doses muito menores, mesmo usando-se o sangue, segundo mostraremos em capitulo posterior, ou quando se applica como "virus" o humor aquoso de um animal infectado por via ocular ou o liquido de lavagem e raspagem peritoneal contendo "rickettsias".

A apreciação da marcha da infecção pela sua curva thermica poderá melhor ser feita nos graphicos de cobaias inoculadas annexados a este trabalho, não sendo indicados os de todas, por desnecessarios (graphicos 1 a 21).

a) *Alterações anatomicas.* - Designámos apenas, como bastante constante e tendo valor diagnostico, o augmento do baço das cobaias inoculadas com o "virus" do nosso typho, augmento ás vezes bem accentuado e apresentando-se o orgam com coloração escura e congestionado. Observam-se frequentemente hemorrhagias sub-cutaneas, vendo-se um edema, por vezes gelatinoso e hemorrhagico, no tecido cellular, principalmente no nivel das regiões inguinaes, nas cobaias que apresentem reacção inflammatoria no escroto. As alterações histopathologicas observadas nos differentes orgãos dos animaes infectados estão sendo objecto de estudo (*). Apenas desejamos salientar que as lesões nodulares observadas communmente com o typho classico europeu não são encontradas, ou talvez sejam muito raras, nos cerebros dos animaes inoculados com o "virus" do typho de São Paulo. Os cerebros de alguns dos nossos animaes infectados apresentaram-se histopathologicamente normaes, apesar de seguramente infectados, o que se poderá attribuir á evolução muito rapida do mal, não havendo tempo para o estabelecimento das alterações histologicas, que seriam bastante especificas no caso do typho do velho continente.

b) *Reacção inflammatoria escrotal.* - Um symptoma a que attribuimos importancia, e que verificámos frequentemente em nossas cobaias, é um augmento de volume com inflammação do escroto. A reacção póde ser ligeira, notando-se apenas um edema mais ou menos accentuado, ou então, havendo edema e maior augmento de volume, iniciando-se por uma vermelhidão da pelle e ficando então os testiculos retidos nas bolsas, nas reacções mais intensas. Nestas observámos muitas vezes petechias a principio pequenas, augmentando depois ao ponto de se fundirem, chegando a formar placas hemorrha-

---

(*) Fornecemos tambem a distinctos collegas histopathologistas, tanto de São Paulo como do Rio, abundante material (de cobaias e *Macacus rhesus*) para estudo mais completo desta parte do problema, sendo que alguns dados a respeito foram já publicados por A. Fialho (Rev. Med. Cir. do Brasil XL(7).1932), do Rio de Janeiro.

Graphico 1

Graphico 2

Graphico 3

Graphico 4

Graphico 5

Graphico 6

Graphico 7

Graphico 10

Graphico 8

Graphico 11

Graphico 9

Graphico 12

Maio 1931
Cobaia 210
Graphico 13
Junho 1931
Cobaia 263
Graphico 14
Junho 1931
Cobaia 265
Graphico 15
Junho 1931
Cobaia 271
Graphico 16
Julho 1931
Cobaia 277
Graphico 17
Julho 1931
Cobaia 284
Graphico 18
Abril 1931
Cobaia 161
Graphico 19

Graphico 20

Graphico 21

gicas. A's vezes este processo termina pela necrose da pelle. A reacção escrotal somente observámos quando o "virus" era inoculado por via peritoneal.

As figuras que acompanham este trabalho dão uma idéa da reacção, de varias intensidades, em cobaias inoculadas com o "virus" por essa via.

As figuras 1 e 2 (Estampa I) correspondem á reacção de pequena intensidade, podendo-se ver o edema e mesmo pequenas petechias hemorrhagicas no escroto. As figuras 3 a 4 (Estampa I) da mesma cobaia photographada de frente e perfil, mostram uma reacção mais accentuada, não podendo os testiculos ser facilmente deslocados das bolsas e observando-se pequenas placas de hemorrhagias cutaneas. A figura 1 e respectiva ampliação na figura 2 (Estampa II) mostram uma reacção mais accentuada ainda, vendo-se nos dois lados do escroto vasta placa hemorrhagica, dando uma idéa da intensidade da reacção nesta cobaia, sendo melhor visivel na figura 1 da estampa III, colorida. As figuras 3 e 4 (Estampa II) mostram outras cobaias com reacção intensa, vendo-se uma placa hemorrhagica num dos lados do escroto e necrose. A figura 2, estampa III, colorida, mostra o aspecto da reacção intensa em outra cobaia, evidenciando-se bem os phenomenos hemorrhagicos cutaneos.

Com o material original e nas primeiras passagens, a reacção escrotal apresentou-se com maior frequencia; posteriormente, a frequencia diminuiu, sendo então observada em varios animaes, depois de uma serie de inoculações onde não era verificada, pelo menos de modo a despertar attenção. Considerando, não só os animaes registados no quadro annexo, como as demais cobaias machos já inoculadas com o "virus", em experiencias diversas, acreditamos que a reacção escrotal, em suas varias intensidades, se manifesta, com os "virus" que estudámos, em cerca de 20 a 25% dos animaes inoculados.

E' possivel que, com as passagens, o "virus" tenha diminuido a sua propriedade de provocar a inflammação escrotal ou, então, que com ellas tenha desapparecido alguma causa coadjuvante que influa no processo e que possa surgir de vez em quando

Este ponto, em todo caso, relativamente ao typho de São Paulo, precisa de ser melhor elucidado, com o estudo de maior numero de amostras do "virus", sendo possivel, como acontece em certas infecções do grupo (tobardillo), que algumas possuam essa propriedade em maior gráu, embora em outras amostras seja menos accentuada e mesmo ausente. A segunda amostra do virus que isolámos comporta-se, a esse respeito, como a original que estudámos.

c) *Immunidade.* - Verifica-se, ainda pelo estudo do quadro, que as cobaias que resistiram á infecção, tendo tido reacção febril caracteristica, se mostram immunizadas a uma segunda inoculação do "virus", seguramente activo, praticada decorrido cerca de um mês. Isto só não se verifica nas cobaias que não mostraram reacção thermica caracteristica ou não a apresentaram de todo, tendo sido inoculadas com material cuja avirulencia ficou demonstrada posteriormente. As que tiveram uma infecção ligeira, tendo sido inoculadas com doses reduzidas de "virus" (principalmente sangue), mostraram-se tambem immunizadas, nas mesmas condições.

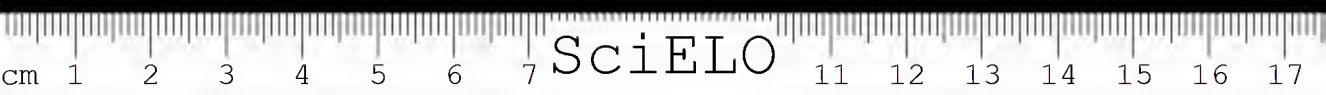
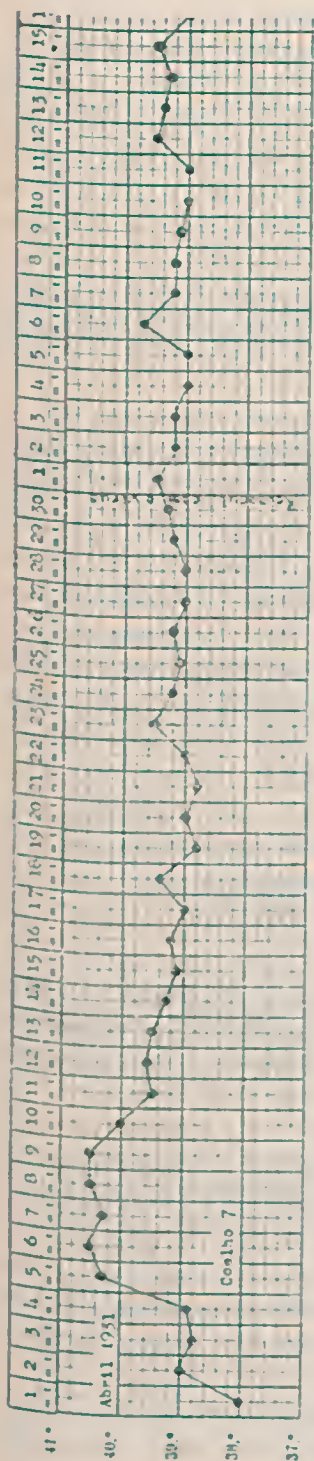
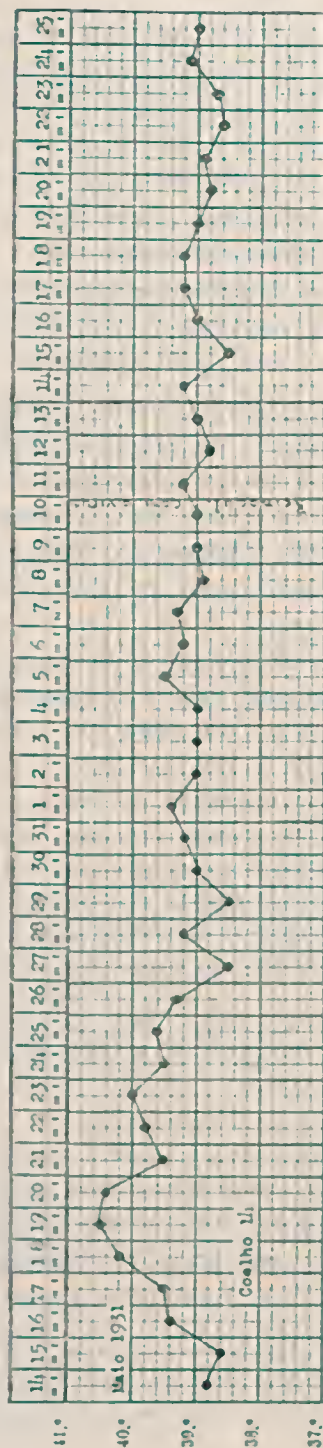
Outros aspectos relativos á immunidade no typho endemico de São Paulo, reacções sorologicas, etc., estão sendo estudados.

B) *Comportamento do "virus" em relação a outros animaes de laboratorio.* - Resumiremos apenas os resultados obtidos com a inoculação de alguns outros animaes.

a) *Coelho.* - O "virus" inoculado, quer por via sub-cutanea, peritoneal ou endo-venosa, provoca uma infecção, geralmente não mortal e que se caracteriza por um periodo de incubação de 3 a 4 dias e um periodo de reacção febril perdurando geralmente de 4 a 6 dias.

Os dois graphicos (22 e 23), correspondentes aos coelhos 7 e 14, mostram a evolução da infecção nestes animaes, de par com sua curva thermica e immunidade a uma segunda inoculação do virus.

b) *Rato branco.* - Dos varios exemplares inoculados com o virus, por via sub-cutanea ou peritoneal, pudemos verificar que a infecção se manifesta de forma geralmente inapparente; ás vezes, pode-se observar pequena reacção thermica pouco acima da media nesse animal que, de outro modo, nada de anormal apresenta. O virus persiste durante certo tempo no organismo do rato e, transferido para a cobaia, determina infecção experimental caracteristica neste animal.

Das varias observações nesse sentido, citamos a experiencia com o *rato branco 6*, inoculado em 2-IV-932 com 3 cc. de sangue da cobaia 666, infectada

Graphico 22

Graphico 23

com o "virus". A temperatura do rato não se modificou da media normal. de 36°,6 a 37°,4. Depois de 10 dias da inoculação, o rato, com a temperatura de 37°,3, foi sangrado, sendo inoculada a *cobaia* 705, em 12-IV-932. A cobaia 705 apresentou infecção caracteristica, com reacção febril durante 8 dias, após incubação de 6 dias, tendo sido sacrificada em 26-IV-932 e sendo obtidas novas gerações deste virus, passado pelo rato.

Verificações semelhantes tivemos com a inoculação do cerebro de ratos. sacrificados alguns dias após a inoculação do virus.

c) *Camondongo branco.* - Apparentemente nada de anormal apresenta como consequencia da inoculação, pelo menos a se julgar pelos resultados obtidos com alguns exemplares.

d) *Rato cinzento* (*Epimys norvegicus*). - Foram inoculados alguns exemplares. O primeiro (*E. norvegicus* 1) foi inoculado por via peritoneal com o "virus" (emulsão de cerebro de cobaia infectada), em 16-IV-931. Apresentou uma pequena reacção thermica acima da media normal no terceiro dia após a inoculação, perdurando 6 dias, com uma oscillação no terceiro dia e volta ao normal no nono dia da inoculação. Uma cobaia (N.° 184) inoculada com sangue do rato (2 cc.), colhido em 24-IV-931, ultimo dia em que a temperatura se mostrou ainda acima da media normal, não apresentou reacção febril e não houve indicio de immunidade quanto a uma segunda inoculação do "virus" Este rato ficou muito mal e foi sacrificado em 13-V-931, sendo inoculada com emulsão do seu cerebro a cobaia n.° 216. A' necropsia do rato verificou-se um abcesso encystado produzindo uma adherencia do baço com a parede peritoneal. A cobaia 216 não apresentou reacção alguma como consequencia da inoculação do cerebro do rato, porém reagiu caracteristicamente, morrendo dentro de 8 dias quando reinoculada, decorridos 28 dias, com o "virus", não se mostrando, pois, immunizada.

O resultado obtido com o outro rato (*Mus rattus* 2) foi mais interessante. Inoculado com "virus" activo, por via peritoneal, em 16-IV-931, não permittiu que fosse tomada a temperatura, por ser exemplar pequeno. Apparentemente, não mostrou symptoma algum, sendo sacrificado em 6-V-931, isto é, 20 dias depois da inoculação, quando foi inoculada com emulsão de seu cerebro a cobaia n.° 215, em 13-V-31. Esta teve reacção febril caracteristica, amanhecendo morta em 21-V-31. Com emulsão de cerebro foi feita nova passagem para a cobaia n.° 229, que teve tambem reacção escrotal e morreu na noite do sexto para o setimo dia da inoculação.

Verifica-se, portanto, que o "virus" pode persistir no organismo do rato, tornando infectante o seu cerebro, mesmo no fim de 20 dias, embora não determine uma infecção apparente.

Outro exemplar (*Epimys norvegicus* 3) foi inoculado com o virus (emulsão cer. da cob. 448) em 23-X-931; nos 3 primeiros dias a media de sua tem-

peratura foi de 37°,1-37°,5, no 4.° dia foi de 38°5, mantendo-se entre 38°,4 a 38°,7, durante 8 dias, quando foi sangrado, morrendo accidentalmente durante esta operação. O seu sangue foi inoculado na cobaia 491 que, decorridos 4 dias, apresentou reacção febril (40°) durante 4 dias. Resistindo á infecção, foi reinoculada com o virus activo (emul. cer. da cob. 508) no fim de 20 dias, não apresentando reacção, mostrando-se, pois, immunizada.

Estas verificações embora reduzidas em numero, apresentam grande importancia epidemiologica, pois indicam que os ratos (*Mus* e *Epimys*) poderão servir de depositarios do virus, podendo-se, por isto, acreditar na possibilidade da transmissão deste ao homem por intermedio de parasitas hematophagos (pulgas, acarianos, etc.), communs nestes roedores (*).

e) *Gato*. - O unico inoculado por via peritoneal, em 25-VI-931, não denunciou nenhum symptoma clinico ou reacção febril. Seu sangue, inoculado na cobaia 290, decorridos 13 dias, não lhe provocou reacção febril nem immunidade ao virus activo.

f) *Carneiro*. - Não apresentou nenhuma reacção caracteristica e não nos foi possivel rehaver o virus, após 10 dias, por inoculação do sangue desse animal em cobaia.

Uma *gallinha* tambem inoculada não apresentou nada de anormal; tambem o seu sangue, no fim de 12 dias, não provocou reacção febril ou immunidade na cobaia 206, com elle inoculada, em relação ao virus activo.

2. - Discussão.

Desde 1912, graças aos trabalhos de Nicolle (18) e collaboradores, em Tunis, e de Gavino e Girard (19) no Mexico, se tornou bem conhecida a sensibilidade apresentada ao typho pela cobaia, que desde então é o animal de escolha para o estudo desta infecção e de infecções affins.

Pelos nossos estudos experimentaes expostos, e que anteriormente já haviamos resumido (20), verifica-se a extrema sensibilidade da cobaia ao virus

---

(*) Em outro trabalho foi estudado com minucia este aspecto do problema relativamente ao typho exanthematico de São Paulo. Mostrámos que, embora possam ser considerados como depositarios, outros deverão ser pesquisados na zona suburbana e rural da cidade, onde a infecção caracteristica se tem manifestado de preferencia. Os ratos desta zona são pouco parasitados por pulgas e o transmissor que maiores probabilidades encerra, segundo nossos estudos experimentaes, é o carrapato, principalmente o *Amblyomma cajennense*.

Por outro lado, de ratos da zona urbana da cidade, intensamente parasitados por pulgas, foi isolado um virus differente, cujas propriedades e relações com o typho exanthematico de São Paulo (virus de doentes da zona suburbana ou rural) são estudadas pormenorizadamente nesse outro trabalho.

do typho exanthematico de São Paulo, que lhe provoca, após uma incubação de 2 a 6 dias, uma reacção febril perdurando geralmente 4 a 8 dias e terminando com a morte de cerca de 70% dos animaes inoculados. As cobaias machos, quando inoculadas no peritoneo, em proporção de 20 a 25%, apresentam uma reacção escrotal caracterizada por edema e inflammação do escroto, podendo ser, ou ligeira (apenas vermelhidão e edema), ou, ás vezes, mais intensa; augmento accentuado do volume do orgam, retenção dos testiculos, petechias e placas hemorrhagicas e, embora raramente, mesmo necrose da pelle.

Esta synthese do comportamento experimental da cobaia com relação ao nosso typhus é sufficiente para mostrar as suas differenças com as outras formas do typho endemico e do typho classico do velho continente.

Deste ultimo se distingue, sob tal aspecto, por apresentar menor periodo de incubação e de reacção febril, e por ser muito mais grave. Ainda histologicamente delle se distingue, pela ausencia ou extrema raridade das lesões nodulares no cerebro, o que se explica talvez pela evolução mais rapida da infecção, assemelhando-se, quanto ao aspecto assignalado, a certas formas de typho endemico da America do Norte.

O typho exanthematico de São Paulo apresenta, relativamente á infecção na cobaia, alguns outros aspectos que o differenciam do typho endemico da America do Norte ou do tobardillo. Segundo Maxcy (21), a incubação no typho endemico dos Estados Unidos é, em media, de 6 a 7 dias (a menor de 4 e a maior de 14 dias) e a duração media da reacção febril de 7 dias, nunca tendo excedido a 14 dias. Estes periodos são um pouco mais curtos no nosso typho. A presença da reacção escrotal verificada primeiramente por Neill (22), em 1918, e muito bem estudada por Mooser (5), observámol-a no nosso typho em menor proporção (cerca de 20 a 25%) do que a assignalada por Neill (70%) e Mooser (92,5%) nas cobaias inoculadas com o typho mexicano e por Maxcy (90%) nas inoculadas com o typho do sul dos Estados Unidos.

No typho endemico do norte, muito raramente se observam phenomenos hemorrhagicos intensos na região escrotal durante a reacção; no nosso são mais frequentes, observando-se nos ultimos dias tambem nas partes glabras (patas principalmente) e podendo, em relação á região escrotal, terminar até pela necrose da pelle, embora isto só aconteça raramente. Como na infecção da America do Norte, a reacção escrotal só se verifica nas cobaias inoculadas no peritoneo, ao contrario do que acontece com a febre maculosa das Montanhas Rochosas, cujo virus parece ter tendencia á localização escrotal, pois provoca ahi reacção mesmo quando inoculado por via sub-cutanea; alem disto, a reacção é geralmente mais accentuada, mais intensos os phenomenos hemorrhagicos, havendo, na maioria dos casos, necrose da pelle.

Mooser e outros têm assignalado raças de virus do typho norte-americano (tobardillo) que provocam reacção escrotal em geral ligeira ou mesmo imperceptivel, ao passo que, com outras raças, tal phenomeno é constante e mesmo tido como pathognomonico; em certos casos, a reacção desapparece após uma serie de passagens para resurgir durante algumas gerações.

Com o typho exanthematico de São Paulo, verificámos a reacção de um modo mais ou menos constante, nas primeiras passagens; mais tarde, tornou-se ella inconstante, reapparecendo em alguns animaes, após uma serie de passagens em que não se observava de uma maneira evidente.

Não podemos ainda formar uma opinião definitiva sobre a reacção escrotal no typho exanthematico de São Paulo, para o que seria necessario um estudo experimental de numerosas amostras do virus, o que não nos foi possivel realizar. Apenas assignalámos os resultados obtidos com as 2 amostras que estudámos e que são objectivados nas photographias que acompanham este trabalho (Estampas I, II e III).

Com relação á febre maculosa das Montanhas Rochosas, verificam-se semelhanças em alguns pontos, como a presença, embora não constante, no nosso typho, de phenomenos hemorrhagicos cutaneos, podendo terminar pela necrose e a accentuada pathogenicidade do virus.

Relativamente ao comportamento experimental do virus para com outros animaes de laboratorio, verificou-se com o typho de São Paulo, no coelho, uma reacção febril durante uma media de 5 dias após incubação de 4, não terminando, em geral, a infecção pela morte. No rato branco, ou cinzento, a infecção é, geralmente, inapparente, evoluindo sem reacção febril que pode, ás vezes, manifestar-se de modo pouco accentuado, ou inapparente, podendo tambem, como mostrámos, esses roedores (*Mus* e *Epimys*) ser depositarios do virus.

As observações sobre o comportamento experimental do virus do typho exanthematico de São Paulo parecem justificar a sua separação como modalidade morbida á parte, provavelmente de natureza autochtona, embora pertencente ao grupo geral das febres exanthematicas, com algumas das quaes se mostrará, talvez, immunologicamente relacionado, não sendo impossivel a sua futura identificação com alguma das formas já descriptas de typho. Esta separação a nosso ver se justifica, por enquanto, não só pelos dados assignalados e por outros que serão mencionados, como pela diversidade do seu mais provavel agente transmissor, elemento que consideramos como bom criterio para a differenciação das infecções desse grupo.

4. - Conclusões.

Estudando o comportamento experimental do virus do typho exanthematico de São Paulo em relação aos animaes de laboratorio, observámos a grande

sensibilidade da cobaia, animal de escolha para o estudo da infecção, pois ella apresenta, após incubação media de 3 a 4 dias, uma reacção febril caracteristica durante 4 a 8 dias, terminando a infecção pela morte em cerca de 70% dos animaes inoculados.

As cobaias machos, inoculadas no peritoneo com o virus, apresentam, em proporção de cerca de 20 a 25%, uma reacção escrotal, caracterizada por edema e inflammação do escroto, podendo-se observar phenomeno hemorrhagicos (petechias e placas hemorrhagicas) nas reacções mais intensas; estes phenomenos hemorrhagicos são observados muitas vezes tambem em certas partes glabras do animal (patas principalmente), no ultimo periodo da infecção e são então muito evidentes logo após a morte.

Os coelhos apresentam reacção febril durante varios dias, após certa incubação, não sendo, geralmente, a infecção mortal.

Com os ratos dá-se, muito provavelmente, uma infecção inapparente, podendo estes roedores desempenhar o papel de possiveis depositarios do virus.

Embora considerando o typho exanthematico de São Paulo uma modalidade á parte, mostramos e discutimos as suas possiveis relações com outras infecções do grupo do typho, principalmente com o typho endemico da America do Norte (tobardillo) e a febre maculosa das Montanhas Rochosas, ou com uma infecção alliada a esta e recentemente assignalada nos Estados Unidos.

Capitulo III

Comportamento experimental do virus em certos simios *(Silenus, Cebus e Alauatta)*

Mostraremos agora o comportamento experimental do virus com relação a certos macacos pertencentes a tres generos (*Silenus, Cebus* e *Alauatta*), resultados já anteriormente resumidos (24) e que agora serão melhor expostos. Foram até agora inoculados 11 *Silenus* (Macacus) *rhesus* Goldf., 1820, 2 *Cebus apella* Lin. e 1 *Alauatta caraya* Humb.

De referencia ás experiencias com os *rhesus*, registaremos sómente os resultados colhidos com a inoculação de 8 exemplares por via peritoneal (*)

(*) Posteriormente outros *Macacus rhesus* foram inoculados com as duas amostras de virus que estudámos. Estes macacos, nos. XII, XIII e XIV, tiveram todos infecção caracteristica, mortal, e forneceram excellente material para passagens e para pesquisas histopathologicas.

A designação de *Macacus rhesus* foi tambem adoptada no texto, por ser communmente empregada, embora a denominação exacta desse simio seja *Silenus rhesus* Goldf., 1820.

outros 3 serviram a experiencia de inoculação do virus pela camara anterior do olho e por isto serão referidos no capitulo seguinte.

O virus era contido em sangue colhido em periodo propicio e em emulção de cerebro de animal infectado, sacrificado em condições favoraveis, e inoculado segundo a technica já exposta.

1. - Resultados da experimentação.

O quadro annexo resume os resultados de nossas experiencias sobre o comportamento do virus com relação a estes simios, sendo consignados tambem os resultados obtidos em cobaias inoculadas com material delles proveniente e que comprovam a infecção dos animaes (Quadro III).

Pelo estudo do quadro verifica-se que o *Macacus rhesus* é bastante sensivel ao virus do nosso typho. Após uma incubação de 2 a 4 dias, observa-se uma reacção thermica caracteristica perdurando uns 4 dias e cahindo bruscamente no fim deste tempo, seguida de collapso e morte do animal.

A evolução clinica da infecção assemelha-se á infecção amarillica experimental, parecendo, embora não tenha sido muito elevado o numero de *rhesus* inoculados, que o virus do nosso typho é para elles mais pathogeno do que o virus amarillico, mesmo o de origem africana (amostra Asibi).

A infecção neste animal apresenta-se, ás vezes, com caracter grave, verificando-se hemorrhagias cutaneas que dão a certas partes mais glabras do corpo (bolsa escrotal, face, etc.) uma coloração arroxeada, com aspecto de ecchymoses, em alguns pontos mais evidentes no ultimo dia e logo após a morte (Estampa IV).

Sómente um dos animaes, *Mac. rhesus* X, não apresentou reacção febril caracteristica, sendo muito provavel, pelos resultados da reinoculação virulenta, que tenha tido uma forma benigna, inapparente, apesar do resultado negativo da inoculação de uma cobaia com o seu sangue, colhido no 11.° dia, o que se poderia attribuir ao facto de não existir na occasião o virus na corrente circulatoria ou existir em muito pequena concentração, incapaz de provocar a immunidade mesmo da cobaia.

Os *Cebus* tambem são sensiveis: dos 2 inoculados, um succumbiu á infecção, tendo tido reacção febril após incubação de 2 dias, e o outro teve apenas reacção febril durante 10 dias, provocando tambem a infecção e immunidade de uma cobaia inoculada com o seu sangue.

Quanto ao representante do genero *Alouatta*, teve elle, após 3 dias de incubação, reacção febril durante 3 dias e morte. Este animal, quando veiu para o nosso laboratorio, apresentava temperatura elevada (40° em media), não sendo, porisso, logo inoculado. Em esfregaços de sangue, verificaram os drs. J. B. Arantes e F. da Fonseca estar elle infectado com certo trypanosoma

QUADRO III

Comportamento do "virus" do typho exanthematico de São Paulo em relação ao Macacus rhesus, Cebus apella e Alauatta caraya

Animal N.º	Data da inoculação	"Virus" inoculado	Dias de incubação	Dias de reacção febril	Resultado da inoculação	OBSERVAÇÕES
Macacus rhesus I	5 - 11 - 31	S. (2,5cc.) da cobaia 24 (sangria no 5.º dia de infecção, temp. 41º,1)	4	2	† noite de 11/12-11-31	Por 2 dias, no periodo dado como de incubação, a temperatura esteve acima do normal, como se vê no graphico correspondente. O macaco apresentou reacção escrotal, mostrando-se a bolsa ecchymotica, desde a vespera da morte
Macacus rhesus II	10 - 11 - 31	S. (2 cc.) do Mac. rhesus I (sangria no 5.º dia da infecção, temp. 41º,1)	2	1	† noite de 16/17-11-31	Desde a vespera, em 16-11-31, o macaco apresentou-se triste, não comeu. Durante o dia foi sugado por carrapatos (Rhipicephalus). A' tarde a temperatura era de 36º,6, começando a hypothermia
Cobaia 38	10 - 11 - 31	S. (2cc.) Mac. rhesus I (sangria no 5.º dia, temp. 41º,1)	5	3	† manhã de 19-11-31	Emulsão de cerebro desta foi inoculada na cobaia 57, proseguindo o virus em novas passagens.
Macacus rhesus III	12 - 11 - 31	Em. cer. Mac. rhesus I	4	4	Sacrificado ás 11 horas de 21-11-31	Ao ser sacrificado, o macaco (exemplar pequeno) apresentava-se muito mal, deitado na gaiola, em franca hypothermia, não podendo resistir por muito tempo.
Cobaia 41	12 - 11 - 31	Em. cer. Mac. rhesus I	4	2	† noite de 18/19-11-31	A morte desta cobaia foi precipitada accidentalmente, visto ter amanhecido imprensada entre as grades da gaiola.

Cobaia 31	16 - II - 31	S. (2cc.) Mac. rhes. II (6.° dia da infecção, temp. 40°,5)	2	3	† noite de 22/23-II-31	
Macacus rhes. IV	17 - II - 31	Em. cer. Mac. rhesus II	2	4	† ás 16 horas de 24-II-31	No dia da morte, mostrou-se muito mal desde a manhã; ás 15 horas estava já em franca hypothermia (36°). A face apresentou-se arroxeada, ecchymotica, o mesmo acontecendo com a pelle ao nivel do escroto, nas palmas das mãos e plantas dos pés.
Macacus rhes. V	21 - II - 31	Em. cer. Mac. rhesus III	1	4	† noite de 26/27-II-31	O animal apresentou a bolsa escrotal arroxeada, com placas ecchymoticas. Com emulsão de cerebro foram inoculados o rhesus VI e varias cobaias, na camara anterior do olho. (Vide capitulo a seguir).
Cobaia 81	25 - II - 31	Em. cer. Mac. rhesus IV	4	2	† noite de 3/4-III-31	O material inoculado esteve conservado no frigo desde a vespera. Emulsão de cerebro desta foi inoculada na cobaia 99, proseguindo o virus em varias passagens.
Cobaia 82	25 - II - 31	S. citratado (1cc.) do Mac. rhesus V (4.° dia da infecção, temp. 40°,9)	3	3	† manhã de 4-III-31	O cerebro desta cobaia, inoculado em outra, (89), não se mostrou infectante, nem provocou immunidade do animal. Dose insufficiente?
Cobaia 84	27 - II - 31	Em. cer. Mac. rhesus V	4	6	Sacrificada em 10-III-31	Emulsão de cerebro desta foi inoculada na cobaia 110, proseguindo o virus em varias passagens.
Macacus rhes. IX	21 - V - 31	Em. cer. cobaia 224	2	4	Sacrificado em 27-V-31, ás 14 horas.	A' necropsia verificou-se que o macaco apresentava tambem tuberculose mesenterica bem evidente.
Cobaia 234	27 - V - 31	Em. cer. Mac. rhesus IX	4	3	Sacrificada em III-VI-31	Outras passagens foram feitas com o virus oriundo desta cobaia.

N.º Animal	Data da inoculação	"Virus" inoculado	Dias de incubação	Dias de reacção febril	Resultado da inoculação	OBSERVAÇÕES
Cobaia 235	27 - V - 31	Em. cer. Mac. rhesus IX	1	3	† manhã de 4 - VI - 31	Observou-se pela necropsia derrame sero-hemorrhagico no peritoneo e pleura
Macacus rhesus X	3 - VI - 31	Em. cer. cob. 234	—	—	Não apresentou reacção febril caracteristica. Forma inapparente.	No 11.º dia após a inoculação foi sangrado e 4cc. do sangue inoculados na cobaia 245, que não apresentou reacção febril e, reinoculada com o virus, não se mostrou immunizada, tendo tido reacção febril caracteristica e morte após incubação de 3 dias. O macaco em 25-VI-31 foi reinoculado com o virus (em. cer. cob. 245), não apresentando reacção febril e mostrando-se immunizado.
Cebus apella 1	3 - VI - 31	Em. cer. cob. 234	2	5	† ás 11 h de 10 - VI - 31	Este macaco teve inicialmente a temperatura elevada (40º,4), talvez pelo facto de se debater e agitar muito ao ser a mesma tomada. Só foi considerada como reacção uma differença de 0,º4 a mais. No ultimo dia da infecção apresentou-se muito mal, não se alimentando e conservando-se sempre deitado na gaiola.
Cobaia 242	10 - VI - 31	Em. cer. Cebus ap. 1	2	5	Sacrificada em 18-VI-31	Emulsão de cerebro desta foi inoculada na cob. 254, proseguindo o virus em outras passagens.
Cobaia 243	10 - VI - 31	Em. cer. Cebus ap. 1 (via sub-cutanea)	4	1	Sacrificada em 18-VI-31	Emulsão de cerebro desta foi inoculada na cob. 255, proseguindo o virus em outras passagens.

Cebus apella II	*10 - VI - 31*	*Em. cer. Cebus I*	*1*	*10*	*Resistiu à infecção*	Em 16-VI-31 foi sangrado e 4 cc. do sangue inoculados no peritoneo da cobaia 247, que apresentou reacção febril durante 4 dias, após uma incubação mais longa, de 9 dias.
Alauatta caraya I	10 - VI - 31	Em. cer. cob. 239	3	3	† ás 12 1/2 h. de 17-VI-31	O virus da cobaia 239 provinha da cobaia 231, oriundo, por sua vez, do **rhesus IX**. No dia da morte, desde a manhã, apresentou-se mal, sempre deitado. A necropsia foi feita immediatamente após a morte.
Cobaia 246	16 - VI - 31	S. (4 cc.) **Alauatta car. I**	1	5	† ás 13 h. de 23-VI-31	Emulsão de cerebro desta foi inoculada na cob. 265, sendo continuadas as passagens.
Cobaia 249	17 - VI - 31	Em. cer. do **Alauatta car. I**	2	4	† noite de 23/24-VI-31	Emulsão de cerebro desta foi inoculada na cob. 267, sendo continuadas as passagens.
Cobaia 250	17 - VI - 31	Em. cer. **Alauatta car. I** (via sub-cutanea)	2	5	† 12 h. de 25-VI-31	Emulsão de cerebro desta foi inoculada na cob. 270, sendo continuadas as passagens.
Macacus rhesus XI	26 - IX - 31	Em. cer. cob. 330 (inocul. com sangue da doente Wanda)	3	2	† noite 1/2-IX-31	O material da inoculação corresponde ao 2.º virus que estudamos (virus W). O macaco apresentou phenomenos hemorrhagicos nas partes glabras (face e escroto).
Cobaia 347	2 - IX - 31	Em. cer. **Mac. rhes. XI**	2	4	Sacrificada em 8-IX-31	As passagens foram continuadas com esta outra amostra do virus.
Cobaia 348	2 - IX - 31	Em. cer. **Mac. rhes. XI**	3	4	† 12 h. de 10-IX-31	

LEGENDA: S = sangue
Em. cer. = emulsão de cerebro.

(*Trypanosoma manguinhense* Fonseca et Arantes, 1932), embora em pequeno numero e difficilmente encontrado em preparações coradas. Depois de alguns dias, quando foi inoculado com o virus, a temperatura se mantinha em media de 39°,2, não sendo mais verificada a presença de trypanosomas, quer em esfregaços ou em exames directos, e sendo negativas as culturas feitas com o sangue do macaco para isolamento desse protozoario.

Embora estes Cebideos existentes entre nós pareçam sensiveis, somente o estudo com maior numero de exemplares permittirá um juizo exacto sobre sua reacção ao virus do typho exanthematico de S. Paulo. Os graphicos annexos mostram as reacções dos simios inoculados, assim como as de algumas cobaias com material delles proveniente (Graphicos 24 a 38).

O estudo histopathologico, como acontece com as cobaias, apresenta elementos (ausencia ou extrema raridade de lesões nodulares no cerebro, etc.) de distincção com o typho classico do velho continente.

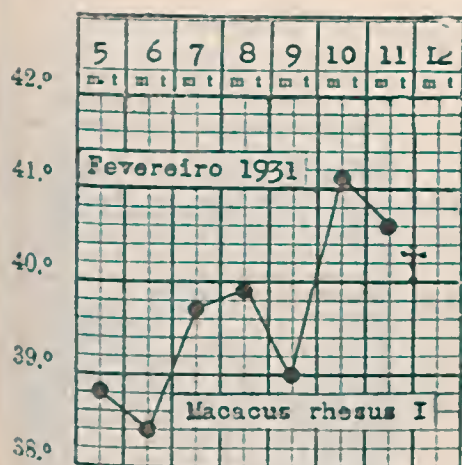
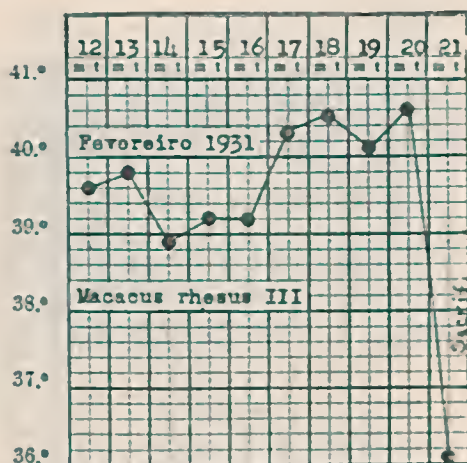
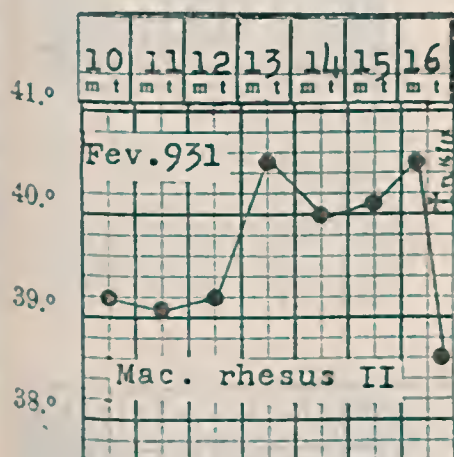
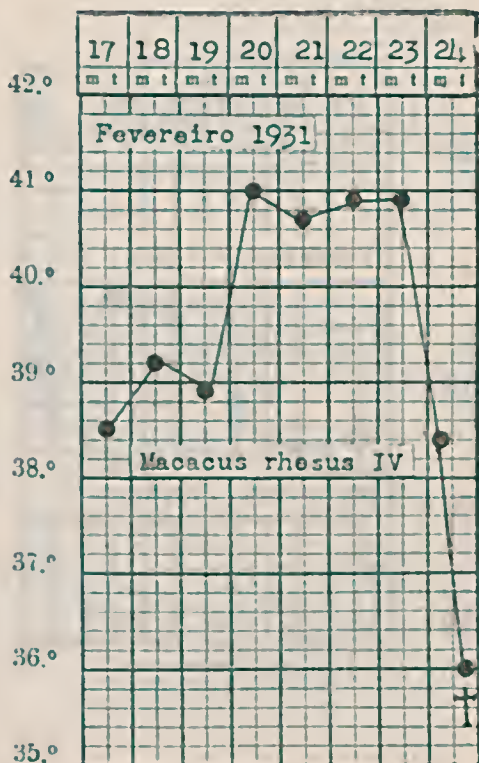
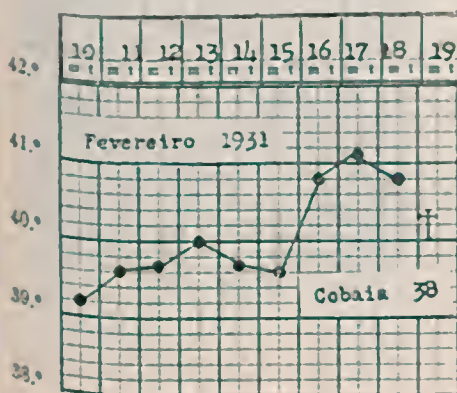
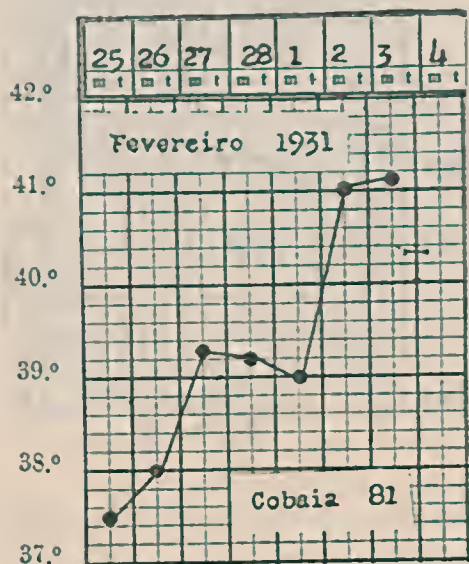
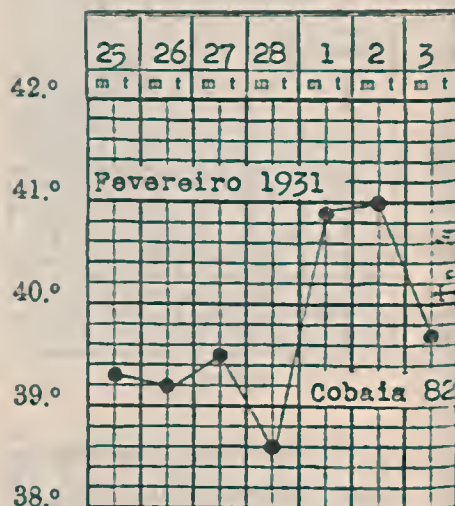
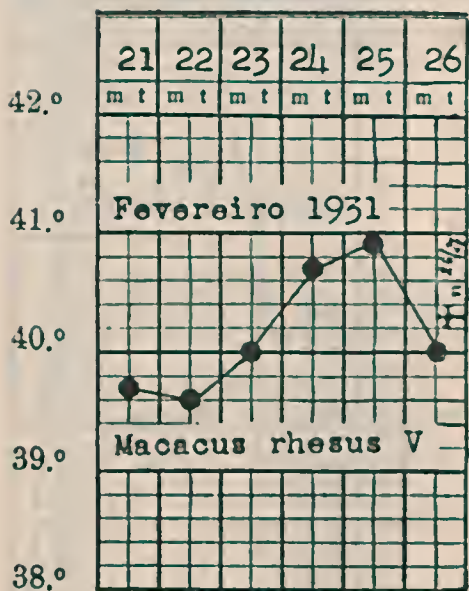
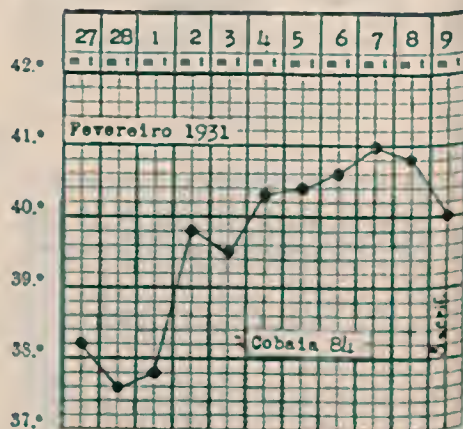
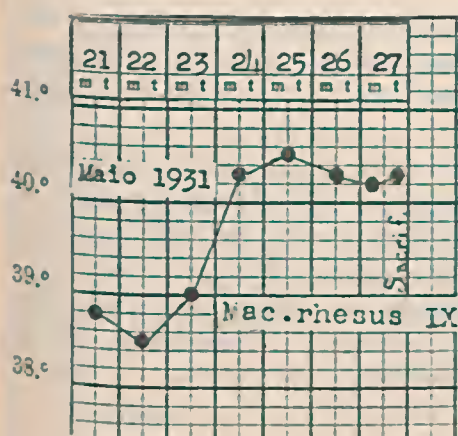
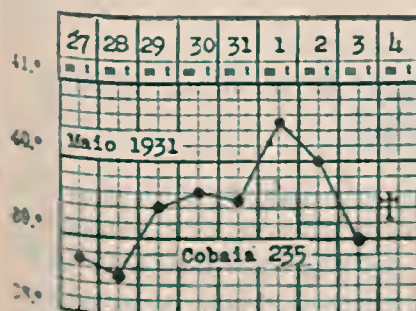
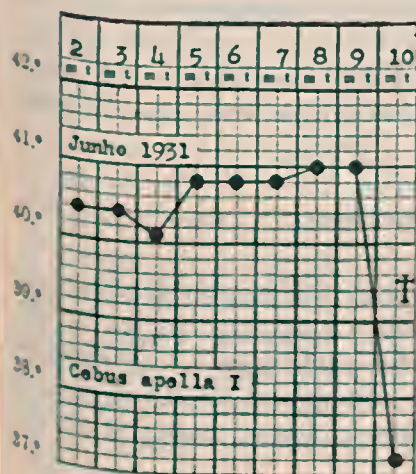
Esse estudo com o material dos nossos macacos foi feito por J. R. Meyer, que provavelmente relatará os seus resultados. Communicou-me este collega ter observado nos macacos lesões semelhantes ás que havia verificado em casos humanos por elle necropsiados e estudados.

O simples comportamento experimental do virus, com relação ao macaco, como vimos no quadro annexo e pelo que já foi assignalado relativamente á cobaia, é sufficiente para dar ao nosso typho uma individualidade propria que o distingue do typho classico e mesmo de outras formas do typho endemico já descriptas e estudadas. Esta distincção apoia-se principalmente numa maior virulencia e pathogenicidade do virus.

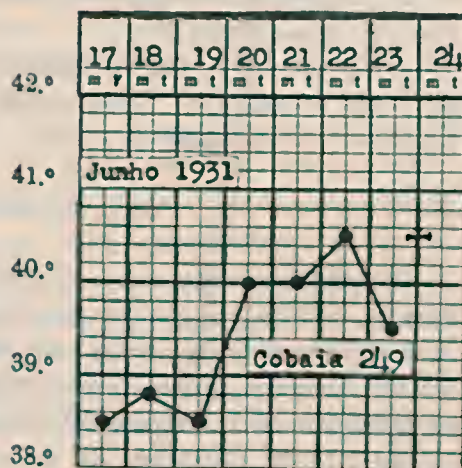
2 - Resumo e conclusões.

A sensibilidade de macacos ao virus das varias infecções pertencentes ao grupo do typho tem sido assignalada por differentes auctores. Em geral, o animal apenas apresenta reacção febril após certa incubação e muito raramente a infecção termina pela morte.

Estudámos o comportamento do virus do typho exanthematico de São Paulo relativamente a simios pertencentes a tres generos (*Silenus*, *Cebus* e *Alouatta*). Quanto aos dois ultimos, embora ficasse evidente a sua sensibilidade ao virus, nada pudemos concluir em definitivo, por termos trabalhado com um numero muito reduzido de exemplares. Com relação ao *Silenus rhesus*, foram assignalados os resultados obtidos pela inoculação, por via peritoneal, de 8 exemplares e os das passagens, comprovadoras da infecção, feitas em cobaias.

Como consequencia da inoculação do virus, verifica-se, após uma incubação de 2 a 4 dias, uma reacção febril caracteristica perdurando cerca de

Graphico 24

Graphico 27

Graphico 25

Graphico 28

Graphico 26

Graphico 29

Graphico 31

Graphico 30

Graphico 32

Graphico 33

Graphico 34

Graphico 35

Graphico 36

Graphico 37

Graphico 38

dias, sendo que, geralmente, a temperatura desce bruscamente, cahindo o animal em collapso seguido de morte. Sob este aspecto a infecção se assemelha á provocada pelo virus amarillico, parecendo, todavia, ser o do nosso typho mais pathogeno ainda para esse animal.

Alguns dos nossos *rhesus* apresentaram infecção de caracter mais grave, verificando-se hemorrhagias cutaneas, manifestadas pela coloração arroxeada de certas partes do corpo (partes mais glabras, face. escroto, etc.), ás vezes, com aspecto de vastas ecchymoses, mais evidentes no ultimo dia e após a morte.

Estes estudos experimentaes, completando os obtidos com outros animaes de laboratorio, especialmente a cobaia, justificam as considerações que já fizemos sobre a caracterização do typho exanthematico de São Paulo e suas relações com as outras formas do typho.

Capitulo IV

Infecção experimental por inoculação do virus na camara anterior do olho

Tendo sido estudado, nos capitulos anteriores, o comportamento experimental do virus do typho exanthematico de São Paulo com relação aos animaes de laboratorio e a certos macacos, mostraremos agora a marcha da infecção quando se emprega como via de inoculação a camara anterior do olho destes animaes. A proposito devemos declarar que essa inoculação visava especialmente a pesquisa de rickettsias nas cellulas endotheliaes da membrana de Descemet e no humor aquoso dos animaes inoculados, o que nos foi suggerido pelos trabalhos de M. Nagayo e collaboradores, no que concerne á tsutsugamushi (25) e ao typho exanthematico (26).

Os primeiros resultados dessa pesquisa foram communicados em nota á Sociedade de Biologia (10) e os estudos feitos no particular serão relatados na 2.ª parte deste trabalho.

Virus empregado e technica

Empregámos como virus: sangue citratado ou desfibrinado de cobaias, infectadas, colhido em periodo de reacção febril e geralmente no seu 4.º dia; emulsão de cerebro de cobaias e de *Silenus rhesus* infectados e sacrificados em occasião favoravel, sendo o orgam triturado e suspenso em solução physiologica na proporção de 1 gr. para 10 cc.; e, finalmente, humor aquoso de cobaias, coelhos e *rhesus* infectados por via ocular.

A quantidade inoculada foi geralmente de 0,1 cc. ou menos, raramente de 0,2 cc., em alguns coelhos. Na injecção utilizámos uma seringa apropriada, munida de agulha fina, immobilizando o globo ocular do animal, que era anesthesiado com ether ou chloroformio, e retirando previamente uma quantidade correspondente de humor aquoso.

A reacção local (ocular) e geral do animal inoculado era observada e a infecção confirmada pelo resultado positivo apresentado, pelas passagens para outros animaes, feitas com humor aquoso ou emulsão de cerebro, ou pela prova de immunidade praticada nos que resistiam á infecção.

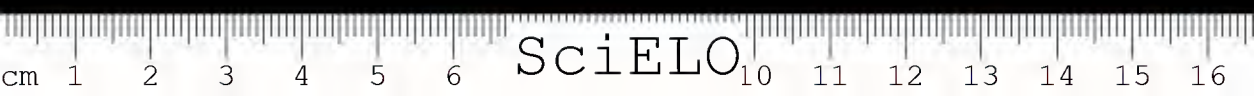
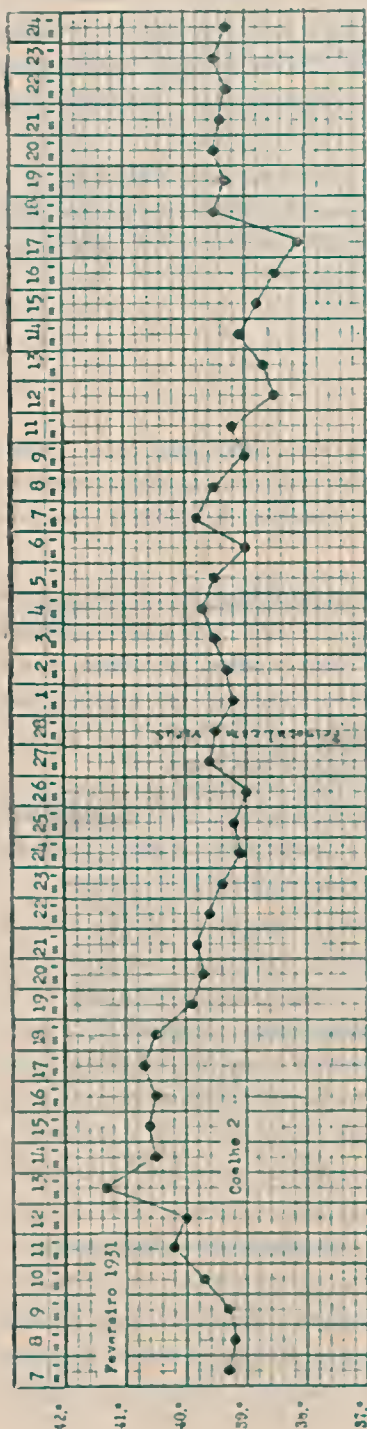
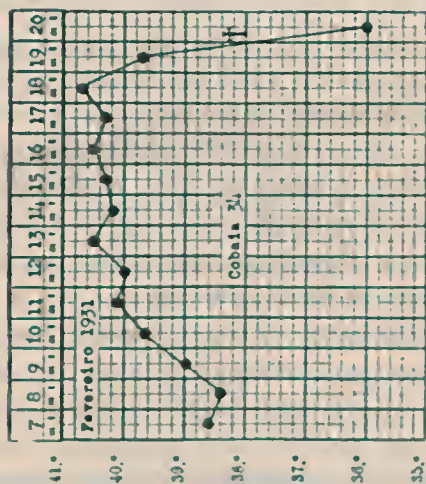
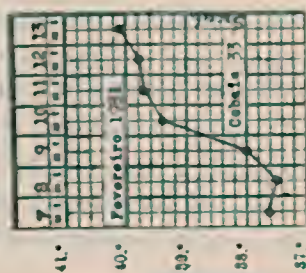
1. - Resultados da experimentação.

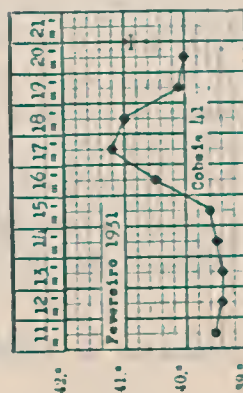
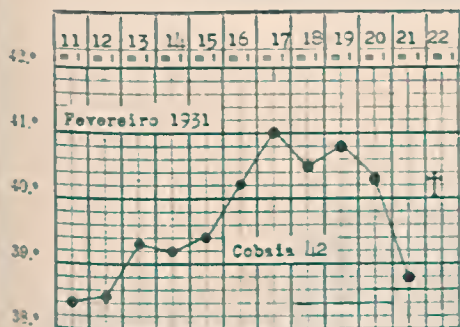
O quadro annexo resume os nossos estudos experimentaes e as passagens realizadas por meio de inoculação do virus por via ocular, assim como as experiencias accessorias relativas á inoculação de emulsão de cerebro dos animaes infectados por aquella via (Quadro IV).

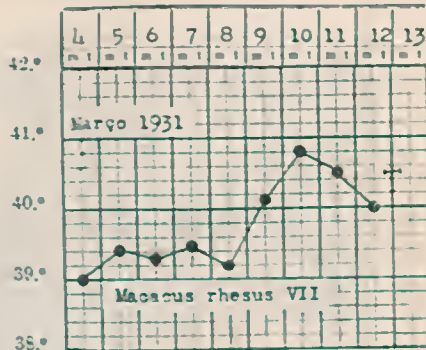
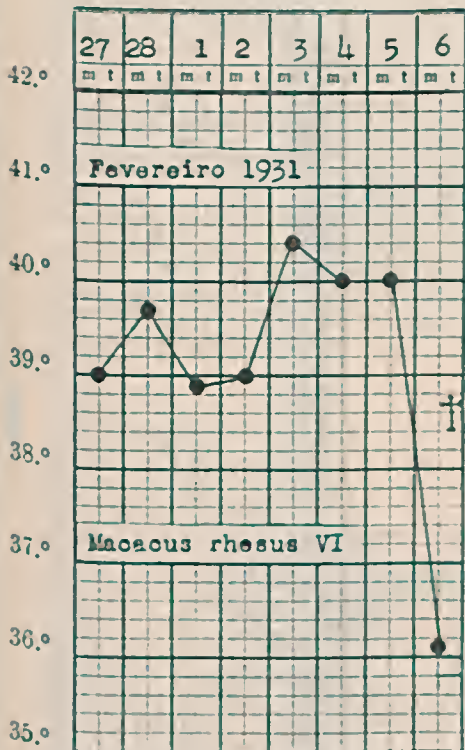
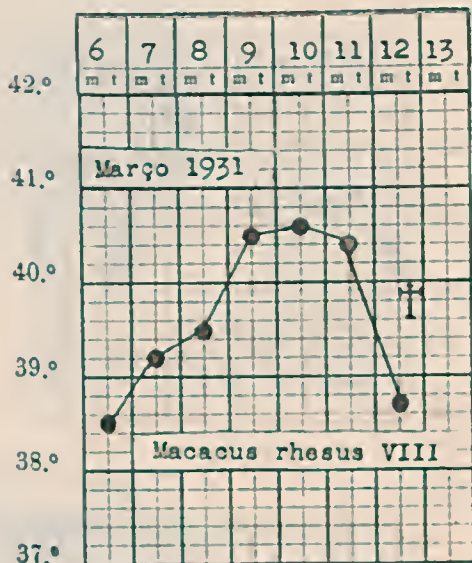
Verifica-se, pelo estudo destes resultados, que a evolução da infecção, após a inoculação do virus pela camara anterior do olho, é mais ou menos identica á que se observa pela inoculação por outras vias (sub-cutanea, peritoneal e venosa), conforme se deprehende de alguns graphicos annexos, nos quaes, aliás, se notam pequenas variações, explicaveis, porém, pela reacção individual ou pela concentração do virus no material inoculado (graphicos 39 a 54).

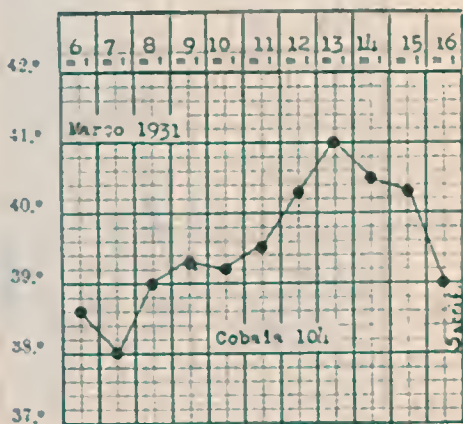
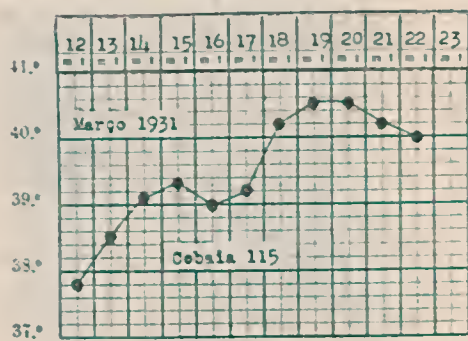
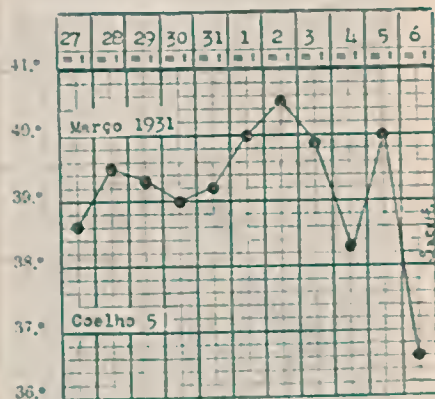
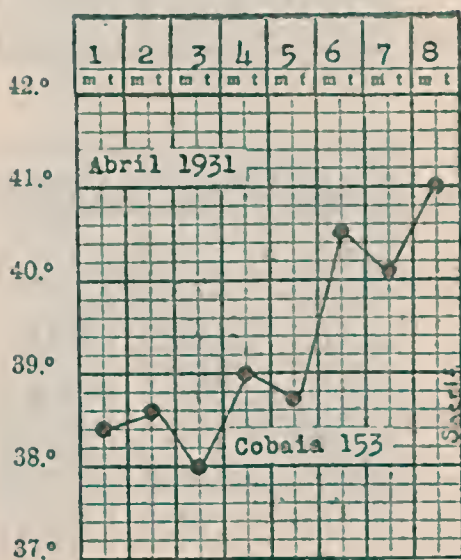
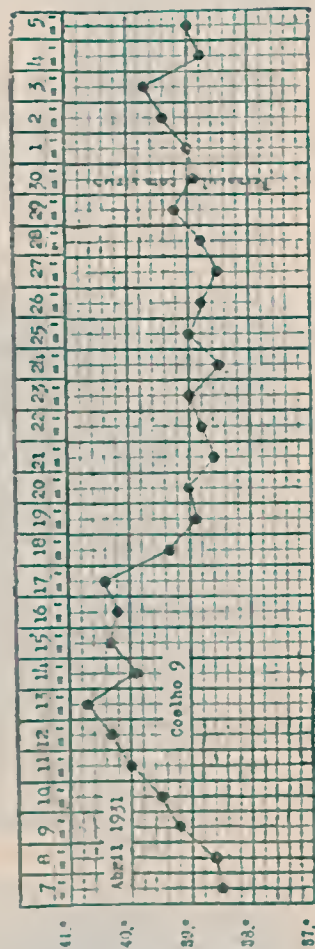
Com a inoculação por via ocular, a infecção se processa com quantidades minimas de virus (menores que 0,1 cc.), talvez insufficientes (tratando-se de sangue), muitas vezes, para provocal-a por outra via, mesmo a peritoneal.

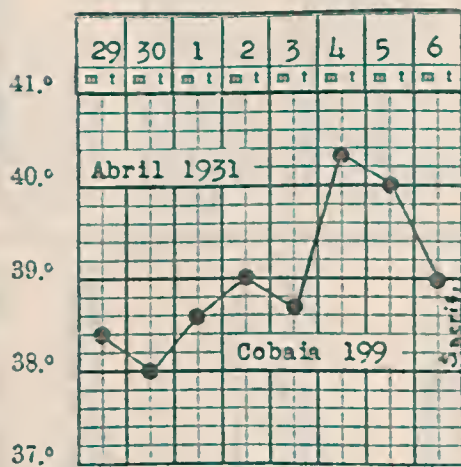
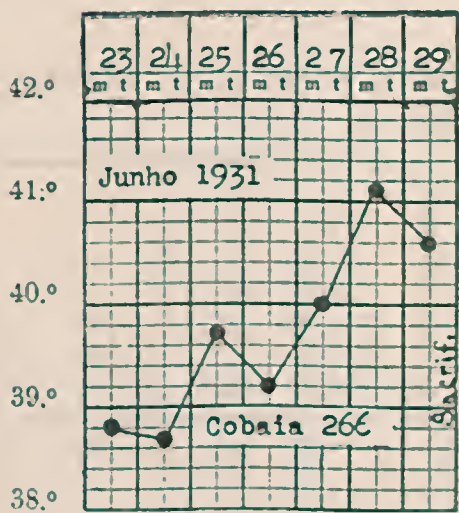
Em certas cobaias inoculadas por via ocular com o sangue virulento, embora tendo apresentado reacção local e geral caracteristica, verificámos que o virus podia ter soffrido uma attenuação, como nos casos das cobaias 32 e 33, e, na passagem com emulsão de cerebro, apenas determinava uma infecção ligeira, com incubação longa, sem provocar immunidade do animal. Este facto é identico ao que se observa ás vezes com o emprego desse material (sangue) em vez de emulsão de cerebro, mesmo por outras vias, visto nelle não ser constante a virulencia ou, melhor, a concentração de virus em todos os periodos da infecção.

Sempre que a infecção se processe de modo caracteristico, isto é, com reacção febril, os animaes, quando resistem, se mostram immunizados quanto á uma segunda inoculação virulenta feita dentro de um mês; não havendo reacção febril, a immunidade não occorre, nem mesmo quando se nota reacção ocular, que terá outra causa, provavelmente contaminação por germes estranhos. Por isto, sempre consideramos como reacção local positiva a seguida de reacção febril caracteristica.

Graphico 39

Graphico 40

Graphico 41

Graphico 42

Graphico 43

Graphico 46

Graphico 44

Graphico 47

Graphico 45

Graphico 48

Graphico 49

Graphico 50

Graphico 51

Graphico 52

Graphico 53

Graphico 54

QUADRO IV

Comportamento do "virus" do typho exanthematico de São Paulo após inoculação na camara anterior do olho de certos animaes

Animal N.°	Data da inoculação	"Virus" inoculado	Via	Dias de incubação	Dias de reacção febril	Resultado da inoculação	OBSERVAÇÕES
Coelho 2	7-11-31	S. (*) cob. 24 (do 7.° dia de infecção, temp. 40°,6)	c. a. o. (**)	3	8	Reacção ocular caracteristica desde o 3.° dia.	Em 28-11-31 foi reinoculado com o virus (em. cer. cob. 59), por via peritoneal, não apresentando reacção febril, e mostrando-se immunizado. Suspenso de observação em 13-III-31.
Coelho 3	7-11-31	Como coelho 2	c. a. o.	3	10	Reac. ocul. 3.° dia, caracteristica no 7.° dia.	Sacrificado em 19-11-31 para pesquisa de Rickettsias.
Coelho 4	7-11-31	Em. cer. (***) cob. 21	c. a. o.	5	9	Reacção ocular ligeira.	Em 12-III-31 foi reinoculado por via peritoneal com o virus (em. cer. cob. 99), não apresentando reacção febril e mostrando-se immunizado. Suspenso de observação em 13-IV-31.
Cobaia 32	7-11-31	S. cob. 24	c. a. o	2	2	Reacção ocular caracteristica intensa desde o 2.° dia.	Sacrificada em 11-11-31 para pesquisa de Rickettsias.
Cobaia 33	7-11-31	S. cob. 21	c. a. o.	2	4	Reacção ocular caract. intensa desde o 2.° dia.	Sacrificada em 13-11-31 para pesquisa de Rickettsias.
Cobaia 31	7-11-31	Em. cer. cob. 24	c. a. o.	3	8	Reacção ocular caract. desde o 2.° dia.	Amanheceu muito mal e prestes a morrer em 20-11-31, sendo sacrificada,
Cobaia 41	11-11-31	S. cob. 32 (2cc., do 1.° dia, temp. 40°)	p. (****)	4	5	† noite de 20/21-11-31	
Cobaia [illegible]	11-11-31	Em. cer. cob. 32	p.	4	5	† manhã de 22-11-31	

Cobaia 43	11 - II - 31	Humor aq. cob. 32	c. a. o.	5	5	Reacção ocular ligeira	† logo após sangria praticada em 21-II-31.
Cobaia 47	13 - II - 31	Em. cer. cob. 33	p.	10	4	Infecção ligeira (?) com incubação mais longa. Resistiu.	Em 20-III-31 foi reinoculada com o virus (em. cer. cob. 113), por via peritoneal. Teve reacção febril após incubação de 11 dias indicando que a infecção ligeira anterior não determinou immunidade completa. † 12 h. 6-IV-31.
Cobaia 48	13 - II - 31	Humor aq. cob. 33	c. a. o.	3	2	Reac. ocul. † manhã 23-II-31	
Cobaia 58	19 - II - 31	Em. cer. coelho 3	p.	1	5	† noite 1/2-III-31	
Cobaia 59	20 - II - 31	Em. cer. cob. 31	p.	3	3	† manhã de 28-II-31	
Cobaia 61	21 - II - 31	S. cob. 43 (0,5cc., colhidos no 10.º dia, temp. 40º)	p.	10	5	Incubação mais longa. Resistiu.	Em 20-III-31 foi reinoculada com o virus (em. cer. cob. 113) por via peritoneal, porem morreu accidentalmente na noite seguinte, 21/22-III-31.
Cobaia 65	21 - II - 31	Em. cer. cob. 43	p.	4	4	† noite 1/2-III-31	
Cobaia 68	23 - II - 31	Em. cer. cob. 42	p.	—	—	Sem reacção febril, morreu durante a noite de 1/2-III-31.	
Cobaia 69	23 - II - 31	Humor aq. cob. 48	c. a. o.	1	3	Reacção ocular intensa	Em 21 horas a temperatura subiu a 40º,3. Foi sacrificada em 27-II-31 para pesquisa de Rickettsias.
Cobaia 70	23 - II - 31	Em. cer. cob. 48	p.	3	5	† 15 h. de 2-III-31	

Animal N.º	Data da inoculação	"Virus" inoculado	Via	Dias de incubação	Dias de reacção febril	Resultado da inoculação	OBSERVAÇÕES
Mac. rh. VI	27 - II - 31	Em. cer. rhesus V (0,1 cc.)	c. a. o	3	3	Congestão conjunctiva ocular, ligeira nebula; hypothermia e † 11 h. 6 - III - 31.	O rhesus V, inoculado com o virus (em. cer. rhes. III) teve infecção caracteristica, morrendo em 5 1/2 dias.
Cobaia 85	27 - II - 31	Em. cer. rhesus V (0,1 cc.)	c. a. o.	1	1	Reacção ocular caracteristica desde o 3.º dia.	Sacrificada em 4-III-31 (5º dia da inocul. e 1.º de reac. febril) para pesquisa de Rickettsias.
Cobaia 86	27 - II - 31	Em. cer. rhesus V (0,1 cc.)	c. a. o.	6	3	Reac. ocul. ligeira (nebula) no 3.º dia; reac. intensa no 7.º dia do inicio de temperatura.	Esta cobaia morreu na noite de 9/10-III-31.
Cobaia 89	27 - II - 31	Em. cer. cob. 69	c. a. o.	—	—	Não se observou reac. local nem geral (febril).	Em 25-III-31 foi reinoculada por via peritoneal com o virus (em. cer. cob. 129). Apresentou reac. febril caracteristica durante 5 dias, após incubação de 1 dias. Este resultado justifica a supposição de que o primitivo virus não houvesse sido convenientemente inoculado na camara anterior do olho.
Cobaia 90	27 - II - 31	Em. cer. cob. 69	p.	2	1	† manhã de 6 - III - 31.	Apenas um dia a temperatura attingiu 40.º, os outros dias houve reacção relativamente á temperatura inicial.
Cobaia 91	28 - II - 31	Em. cer. cob. 59	p.	3	7	† noite de 10/11 - III - 31.	
Cobaia 93	2 - III - 31	Em cer. cob. 65	p.	2	5	† 13 h, de 11 - III - 31.	
Cobaia 95	2 - III - 31	Em. cer. cob. 58	p.	3	9	† noite de 14/15 - III - 31.	

Cobaia 96	2 - III - 31	Em. cer. cob. 70	p.	3	2	† manhã de 8-III-31	
Cobaia 100	4 - III - 31	Humor aq. cob. 85	c. a. o.	5	4	Reac. ocul. caract. Humor puncelonado por 2 vezes para reinoculação.	Sacrificada em 11-III-31 para pesquisa de Rickettsias.
Cobaia 101	4 - III - 31	S. cob. 85 (2 cc.)	p.	2	4	† noite de 10/11-III-31.	
Cobata 102	1 - III - 31	Em. cer. cob. 85	p.	5	2	† noite de 11/12-III-31	
Mac. rh. VII	4 - III - 31	Humor aq. rhesus VI	c. a. o	4	4	Reac. ocul. Congestão conjunctiva. Signaes de Iritе. † noite de 12/13-III-31	O humor inoculado foi obtido por punção praticada nesse dia no rhesus VI.
Mac. rh. VIII	6 - III - 31	Em. cer. rhesus VI	p.	2	3	† 17 h. de 12-III-31.	
Cobaia 103	6 - III - 31	Em. cer. rhesus VI	p.	4	3	† manhã de 14-III-31	
Cobaia 104	6 - III - 31	Humor aq. rhesus VI	c. a. o	5	4	Reac. ocul. caract. desde o 6.º dia.	Sacrificada em 16-III-31 para pesquisa de Rickettsias.
Cobaia 105	6 - III - 31	Em. cer. rhesus VI	c. a. o	5	2	Reac. ocul. caract. desde o 6.º dia.	Sacrificada em 11-III-31 para pesquisa de Rickettsias.
Cobaia 108	10 - III - 31	Humor aq. cob. 87	c. a. o	4	5	Reac. ocul. caract. desde o 6.º dia.	Sacrificada em 21-III-31 para pesquisa de Rickettsias.
Cobaia 109	10 - III - 31	Em. cer. cob. 87	p.	2	8	† Manhã de 21-III-31	
Cobaia 111	11 - III - 31	Em. cer. cob. 92	p.	1	3	† manhã de 19-III-31	
Cobaia 115	12 - III - 31	Humor aq. cob. 100	c. a. o.	5	5	Reac. ocul. caract. desde o 4.º dia.	† noite de 22/23-III-31.

Animal N.º	Data da inoculação	"Virus" inoculado	Via	Dias de incubação	Dias de reacção febril	Resultado da inoculação	OBSERVAÇÕES
Cobaia 116	13 - III - 31	Em. cer. Mac. rh. VIII	p.	0	1	† noite de 20/21-III-31	
Cobaia 117	13 - III - 31	Humor aq. Mac. rh. VII	c. a. o.	2	4	Reac. ocul. caract. desde o 3.º dia.	Sacrificada em 19-III-31 para pesquisa de Rickettsias.
Cobaia 118	13 - III - 31	Em. cer. Mac. rh. VII	p.	2	2	† noite 19/20-III-31	
Cobaia 119	14 - III - 31	Em. cer. cob. 103	p.	3	4	† noite de 21/22-III-31	
Cobaia 120	14 - III - 31	Humor aq. cob. 105	c. a. o.	1	7	Reac. ocul. caract. desde o 2.º dia.	† noite de 22/23-III-31.
Cobaia 123	14 - III - 31	Humor aq. cob. 100	c. a. o.	1	6	Reac. ocul. caract. desde o 2.º dia, perdurando durante a reac. febril.	Sacrificada em 23-III-31 para pesquisa de Rickettsias.
Cobaia 126	19 - III - 31	Em. cer. cob. 111	p.	4	5	† 12 h. de 2-IV-31.	
Cobaia 127	19 - III - 31	Humor aq. cob. 117	c. a. o.	1	2	Reac. ocul. desde o 1.º dia.	No 2.º dia apresentou reacção febril (40º,5) com volta ao normal e nova ascensão após a incubação. Sacrificada em 25-III-31 para pesquisa de Rickettsias.
Cobaia 130	21 - III - 31	Em. cer. cob. 109	p.	2	3	† noite de 27/28-III-31	
Cobaia 131	21 - III - 31	Humor aq. cob. 108	c. a. o.	3	4	Reacção ocul. desde o 2.º dia.	Sacrificada em 28-III-31 para pesquisa de Rickettsias.

Cobaia 133	23 - II - 31	Humor aq. cob. 122	c. a. o.	3	3	Reacção ocular intensa.	† noite de 29/30-III-31, sendo feito pesquisa de Rickettsias.
Cobaia 134	23 - II - 31	Em. cer. cob. 122	p.	1	7	† 13 h. de 2 - IV - 31	Reacção escrotal intensa, com placas hemorrhagicas e necrose nos ultimos dias.
Cobaia 143	27 - III - 31	S. cob. 128 (colhido no 7.° dia, temp. 40°,6)	c. a. o.	2	2	Reacção ocular caracteristica desde o 3.° dia.	Sacrificada em 31 - III - 31 para pesquisa de Rickettsias.
Coelho 5	27 - III - 31	S. cob. 128 (colhido no 7.° dia, temp. 40°,6)	c. a. o.	4	4	Reac. iniciada no 2.° dia, caract. no 5.° dia.	Em hypothermia e muito mal, foi sacrificado na manhã de 6 - IV - 31.
Cobaia 141	28 - III - 31	Humor aq. cob. 131.	c. a. o.	—	—	Reac. ocul. não caract., embora intensa, porem com aspecto de suppuração do humor. Não teve reacção febril.	Em 22 - IV - 31 foi reinoculada com o virus (em. cer. cob. 169), por via peritoneal, tendo reacção febril caracteristica durante 6 dias, após 2 dias de incubação; morreu na manhã de 1/2-V-31.
Cobaia 151	31 - III - 31	Humor aq. cob. 143	c. a. o.	—	—	Apenas ligeira opacidade de cornea, sem congestão conjunctival e sem reacção febril.	Em 22 - IV - 31 foi reinoculada com o virus (em. cer. cob. 169), por via peritoneal, tendo tido reacção febril caracteristica durante 3 dias. Morreu na noite de 29/30-IV-31.
Cobaia 153	1 - IV - 31	Em. cer. cob. 135	c. a. o.	4	3	Reac. ocul. intensa, com exophtalmia, desde o 1.° dia de reac. febril (5.°)	Sacrificada em 8-IV-31 para pesquisa de Rickettsias.
Cobaia 154	1 - IV - 31	Em. cer. cob. 135	c. a. o.	5	2	Reac. ocul. caract. sómente desde o 5.° dia.	Sacrificada em 8-IV-31 para pesquisa de Rickettsias.
Coelho 6	1 - IV - 31	Em. cer. cob. 135	c. a. o.	3	3	Reac. ocul. caract. desde o 4.° dia.	Sacrificada em 7-IV-31 para pesquisa de Rickettsias.

Animal N.º	Data da inoculação	"Virus" inoculado	Via	Dias de incubação	Dias de reacção febril	Resultado da inoculação	OBSERVAÇÕES
Coelho 8	6 - IV - 31	Humor aq. coelho 5	c. a. o	—	—	Não apresentou reacção local. Apenas ligeiro pannus.	Em 2-V-31 foi reinoculado, por via peritoneal, (em. cer. cob. 185), tendo tido reac. febril durante 5 dias, após 2 dias de incubação. Este resultado se explica por uma attenuação do virus, por ter sido pequena a sua concentração no sangue primitivamente inoculado na camara anterior do olho do coelho 5.
Coelho 9	7 - IV - 31	Humor aq. coelho 6	c. a. o.	3	7	Reac. ocul. caract.	Reinoculado em 30-IV-31, por via peritoneal, (em cer. cob. 180), não apresentou reac. febril. Immunizado em virtude da infecção anterior. Suspenso de observação em 30-V-31, após sangria.
Cobaia 158	7 - IV - 31	Em. cer. coelho 6	p	13	1	† 11 h. de 21-IV-31	Observou-se derrame peritoneal, com abundante hemorrhagia, em consequencia de rompimento do figado.
Cobaia 159	7 - IV - 31	Humor aq. coelho 6	c. a. o.	—	—	Não apresentou reac. local nem geral (febril); provavelmente o material não foi inoculado na c. a. o.	Em 22-IV-31 foi reinoculada, por via peritoneal, com o virus (em. cer. cob. 169), tendo tido reacção febril caracteristica por 6 dias, após incubação de 2 dias. Morreu na noite de 1/2-V-31.
Cobaia 160	8 - IV - 31	Em. cer. cob. 153.	c. a. o.	3	5	Reac. ocul. caract. desde o 4.º dia.	Sacrificada em 16-IV-31 para pesquisa de Rickettsias.
Coelho 11	13 - IV - 31	S. cob. 123 (0,1 cc.) colhido no 5.º dia, temperatura 41º.	c. a. o.	3	6	Reac. local caract. do 3.º até no 10.º dia.	Em 11-V-31 foi reinoculada por via peritoneal com o virus (em. cer. cob. 203), não apresentando reacção febril e mostrando-se immunizada. Foi sangrada e suspensa de observação em 30 - V - 31.

Cobaia 168	13 - IV - 31	S. cob. 123 (0,1 cc.) 5.° dia, temp. 41.°.	c. a. o.	6	3	Reac. ocul. caract. desde o 3.° dia.	Sacrificada em 22-IV-31 para pesquisa de Rickettsias.
Coelho 12	16 - IV - 31	Em. cer. cob. 98 (virus 152).	c. a. o	11	3	Não se observou reacção ocular.	Em 11-V-31 foi reinoculado por via peritoneal com o virus (Em. cer. cob. 203), mostrando-se immunizado. Foi sangrado e suspenso de observação em 28-V-31.
Cobaia 173	16 - IV - 31	Em. cer. cob. 98 (virus 152)	c. a. o.	5	3	Reac. ocul. caract. desde o 4.° dia.	Sacrificada em 21-IV-31 para pesquisa de Rickettsias.
Cobaia 181	22 - IV - 31	Humor aq. cob. 168	c. a. o.	—	—	Reac. local atypica, sem reac. geral.	Em 11-V-31 foi reinoculada por via peritoneal com o virus (em. cer. cob. 203), tendo reac. febril caract. após uma incubação de 2 dias e sendo sacrificada em 19-V-31.
Cobaia 183	21 - IV - 31	Humor aq. cob. 173	c. c. o	4	2	Reac. ocular caract., porem ligeira.	Sacrificada em 29-IV-31 para pesquisa de Rickettsias.
Cobaia 199	29 - IV - 31	Humor aq. cob. 183	c. a. o.	4	2	Reac. ocul. caract. pouco accentuada do 2.° ao 10.° dia.	Sacrificada em 6-V-31 para pesquisa de Rickettsias.
Cobaia 204	6 - V - 31	Humor aq. cob. 199	c. a. o		—	Não se observou reac. local; talvez o virus não tenha sido convenientemente injectado.	Em 26-V-31 foi reinoculada por via peritoneal com o virus, não se mostrando immunizada, tendo tido reacção febril durante 4 dias, após 2 dias de incubação e morrendo ás 15 horas de 3-VI-31.
Coelho 15	27 - V - 31	Em. cer. rhesus IX	c. a. o.	4	2	Reac. ocul. caract.	Sacrificado em 2-VI-31 para pesquisa de Rickettsias.
Cobaia 236	27 - V - 31	Em. cer. rhesus IX	c. a. o.	4	2	Reac. ocul. caract.	Sacrificada em 2-VI-31 para pesquisa de Rickettsias.
Coelho 16	2 - VI - 31	Humor aq. coelho 15	c. a. o	7	4	Reac. ocul. caract., porem ligeira.	Sacrificado em 13-VI-31 para pesquisa de Rickettsias.

Animal N.º	Data da inoculação	"Virus" inoculado	Via	Dias de incubação	Dias da reacção febril	Resultado da inoculação	OBSERVAÇÕES
Cobaia 237	2 - VI - 31	Humor aq. cob. 236	c. a. o.	3	4	Reac. ocul. desde o 4.º dia.	Sacrificada em 9-VI-31 para pesquisa de Rickettsias.
Cobaia 238	2 - VI - 31	Em cer. cob. 236	p.	3	8	† noite de 16/17-VI-31	
Cobaia 240	9 - VI - 31	Humor aq. cob. 237	c. a. o.	1	3	Reacção ocular característica.	Sacrificada em 17-VI-31 para pesquisa de Rickettsias.
Cobaia 241	9 - VI - 31	Em. cer. cob. 237	p.	5	3	† noite de 18/19-V-31	
Coelho 17	13 - VI - 31	Humor aq. coelho 16 (olho infectado)	c. a. o.	—	—	Observou-se apenas ligeiro pannus.	Embora sem reacção geral, os dois coelhos, mesmo o inoculado com humor do olho normal, mostraram-se immunizados relativamente a inoculação posterior do virus (em. cer. cob. 251), feita em 25-VI-31.
Coelho 18	13 - VI - 31	Humor aq. coelho 16 (olho normal)	c. a. o.	—	—	Não se observou reacção local.	
Cobaia 248	17 - VI - 31	Humor aq. cob. 240	c. a. o.	4	2	Reacção ocular ligeira.	Sacrificada em 23-VI-31 para pesquisa de Rickettsias.
Cobaia 266	23 - VI - 31	Humor aq. cob. 248	c. a. o.	3	3	Reacção ocular característica.	Sacrificada em 29-VI-31 para pesquisa de Rickettsias.
Cobaia 271	29 - VI - 31	Humor aq. cob. 266	c. a. o.	10	7	Reacção ocular ligeira	Reinoculada com o virus (em cer. cob. 315) em 30-VII-31, mostrando-se immunizada.
Cobaia 332	22-VIII 31	S. citratado da doente Wanda (amostra do virus W)	c. a. o.	1	1	Reacção ocular ligeira	Sacrificada em 27-VIII-31 para pesquisa de Rickettsias.
Cobaia 333	22-VIII-31	Idem	c. a. o.	4	8	† manhã de 4-IX-31	As passagens foram continuadas com esta nova amostra do virus (W).

LEGENDA:
(*) S. = sangue
(**) c. a. o. = camara anterior do olho
(***) Em. cer. = emulsão de cerebro
(****) p. = peritoneal
† Morte do animal

A reacção geral, isto é, febril, provocada pela inoculação do virus na camara anterior do olho das cobaias, coelhos e *Macacus rhesus*, é indicada no quadro, de modo que apenas diremos algumas palavras a respeito da reacção local, ocular, nestes animaes.

Reacção ocular - Após a inoculação do virus na camara anterior do olho, sobrevêm certos symptomas oculares que podem ser considerados como especificos e que apparecem do 2.° ao 5.° dia, geralmente tendo o maximo de intensidade correspondente ao da reacção geral.

No coelho a reacção ocular não é muito accentuada, em geral observa-se lacrimejamento, congestão pericorneal e uma irite aguda, com aspecto de irite serosa, em virtude do augmento de volume do humor e da tensão intra-ocular; a opacidade da cornea é ligeira ou inexiste, podendo-se, por isto, facilmente ver os signaes da irite; estes signaes desapparecem depois de alguns dias, geralmente com a volta da temperatura ao normal, podendo apenas persistir, ás vezes, ligeira nebula.

Na cobaia, os symptomas são muito mais accentuados: a inflammação é mais aguda e maiores o edema e congestão da conjunctiva, secreção e lacrimejamento; os signaes da irite são mais difficeis de ser verificados, pela coloração pigmentar do olho deste animal e porque a opacidade da cornea, mais ou menos accentuada, é mais precoce; ás vezes, a reacção é muito intensa, havendo exophtalmia em virtude do augmento muito pronunciado do humor e da tensão intra-ocular. Verificámos, em algumas cobaias, contaminação do humor por germes estranhos, geralmente um diplococco Gram-positivo, depois de algumas passagens, o que se pode attribuir á maior difficuldade technica da inoculação na camara anterior do olho destes animaes.

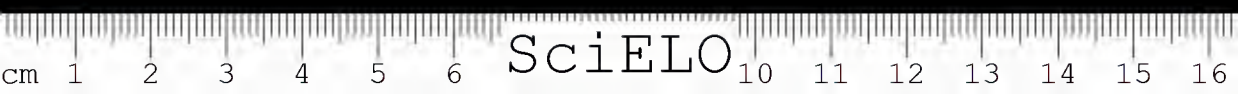
No *Silenus rhesus*, a reacção é localmente pouco accentuada, mais comparavel á que se observa no coelho, talvez ainda menor.

Immunidade - Verificámos, por muitas experiencias, que os animaes que apresentavam reacção local e geral caracteristica e sobreviviam, se mostravam immunizados relativamente a uma segunda inoculação do virus.

Verificámos ainda que as cobaias immunizadas em consequencia da inoculação do virus por via peritoneal não reagiram, quando applicada uma segunda inoculação por via ocular. Estas experiencias foram feitas, entre outras, nas cobaias 4 e 31, que não reagiram febrilmente, embora tivessem tido reacção local, provavelmente traumatica, atypica.

Estes resultados de immunização cruzados das vias de inoculação, mostram que, pela ocular, a infecção se processa nas mesmas condições que pelas outras.

- Discussão e resumo.

Conforme acontece com o virus da tsutsugamushi e do typho exanthematico, segundo as verificações de Nagayo e collaboradores (25, 26), o virus do

typho exanthematico de São Paulo provoca, quando inoculado na camara anterior do olho de certos animaes (cobaias, coelho e *Silenus rhesus*) uma reacção ocular caracteristica. Este phenomeno é seguido tambem de reacção geral, febril, semelhante á provocada nesses animaes pela inoculação do virus por via peritoneal.

Os nossos resultados, já anteriormente resumidos (27) são consignados no quadro que acompanha o presente trabalho. Verifica-se que o comportamento experimental do virus do typhus de São Paulo, quando inoculado pela via ocular, corresponde mais ou menos ao provocado pela inoculação por outras vias; á reacção geral, febril, dos animaes e á marcha da infecção já assignaladas, accresce uma reacção local, nitida, no olho inoculado, caracterizada por inflammação e congestão da conjunctiva, lacrimejamento e opacidade mais ou menos accentuada da cornea e signaes de irite. Estes symptomas, geralmente mais intensos na cobaia do que no coelho e *rhesus*, manifestam-se do 2.º ao 5.º dia da inoculação, accentuando-se durante a reacção geral do animal e persistindo durante alguns dias.

A reacção ocular e a infecção processam-se, por essa via, pela inoculação de doses pequenas (0,1 cc. e menos) do virus (sangue virulento ou emulsão de cerebro de animaes infectados colhidos em occasião propicia), muitas vezes incapazes, principalmente tratando-se de sangue, de determinar a infecção pela via sub-cutanea e peritoneal. A infecção provocada por via ocular determina, nos animaes que sobrevivem, uma immunidade quanto á inoculação pelas outras vias e, da mesma forma, os immunizados por estas e reinoculados na camara anterior do olho não apresentam a reacção local caracteristica acompanhada de reacção geral, febril.

Registámos inoculações do virus por via ocular e algumas passagens, utilizando-nos na inoculação somente do humor aquoso de um animal anteriormente infectado por essa via.

Estes estudos, realizados principalmente com o fim de pesquisar nos animaes inoculados a presença de rickettsias ou microorganismos semelhantes nas cellulas epitheliaes da membrana de Descemet e no humor aquoso, representam, como se vê, uma confirmação dos trabalhos de Nagayo e collaboradores, realizados com infecção affim. Quanto ao fim visado, diremos apenas que, naquellas cellulas e mesmo em macrophagos encontrados no humor, podem ser postos em evidencia microorganismos que não se distinguem das rickettsias, de accordo com as descripções dos auctores que dellas se têm occupado, devendo, na pesquisa, o animal ser sacrificado em occasião favoravel e que corresponda ao maximo de intensidade da reacção local e geral.

Sendo a via intra-ocular tambem favoravel á infecção experimental, deve ser a preferida sempre que se tentar o isolamento do virus, afim de se verificar si este, no sangue dos doentes, apresenta comportamento experimenta-

...entico ao manifestado após passagem pelos animaes de laboratorio. Tal facto ...ós o demonstramos com a amostra do virus que isolámos. O sangue citratado ... uma doente (virus W), inoculado na camara anterior do olho de cobaias e ...elhos, determinou a infecção nas mesmas condições que após a inoculação ...eritoneal.

... - **Conclusões.**

I. O virus do typho exanthematico de São Paulo, inoculado na camara an...terior do olho de certos animaes (cobaia, coelho e *Silenus rhesus*) determina ...ma reacção ocular caracteristica e reacção geral, febril, semelhante á provo...cada por sua inoculação por via peritoneal.

II. Estas reacções são especificas da infecção pelo virus, em virtude dos ...esultados das passagens obtidos pela inoculação de sangue ou emulsão de ce...rebro das cobaias infectadas por via ocular e da immunidade dos animaes que ...esistiam á reinoculação do mesmo virus pelas outras vias.

III. O virus pode ser transmittido em serie por via ocular, utilizando-se ...ara a inoculação o humor aquoso de um animal anteriormente injectado por ...sa via.

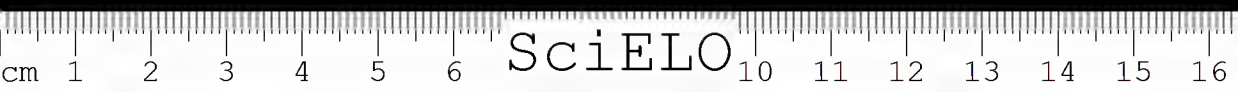
Capitulo V

Algumas propriedades do virus

Embora já resumidas em nota anterior (28), mostraremos agora com mais ...ormenor algumas propriedades do virus que estudámos, entre as quaes a sua ...trabilidade, passagem através das mucosas, resistencia ao deseccamento, á ...ção da glycerina pura ou diluida e á congelação.

Alguns destes estudos representam a confirmação de factos já estabelecidos ...m relação ao typho classico e certas infecções affins; apresentam, em todo ..., o interesse de terem sido realizados com uma nova modalidade de infecção ...o grupo das "febres typho-exanthematicas". Correspondem tambem a resul...tados preliminares de estudos ainda não definitivamente concluidos.

... - **Filtrabilidade do virus.**

Material e technica. - As experiencias de filtração foram feitas com velas ...e porcelana (Chamberland L3 e L5) e diatomaceas (Mandler, de 7 lbs. de ...ressão, e Berkefeld N). As Chamberland e Mandler, embora já utilizadas

anteriormente, verificámos estarem em boas condições pela esterilidade dos filtrados do liquido previamente addicionado de uma cultura microbiana (estaphylococco). A Berkefeld usada era nova, sendo sua integridade verificada da mesma forma. A filtração foi feita sob pressão negativa de 30 a 40 cm. de Hg.. O virus era constituido por cerebro de cobaia infectada, colhido em occasião propicia (4.° dia da reacção febril), emulsionado rigorosamente em agua physiologica e caldo glycosado a 1% (pH=8,0) na proporção de 1 gr. do orgam para 10 e 20 cc. do vehiculo. O sangue virulento foi citratado e diluido antes da filtração em agua physiologica na proporção de 1 para 2, sendo utilizado em uma experiencia. Os resultados obtidos podem assim ser resumidos:

Experiencia I. - *Cobaia* 15: inoculada em 21-I-931 com 5 cc. de filtrado, em vela Chamberland L3, de emulsão, em agua physiologica (1 gr. para 10 cc.), do cerebro da cobaia 8, infectada. Não apresentou reacção febril e foi reinoculada, em 25-II-931, com o virus activo (emulsão de cerebro do S. *rhesus* IV), não se mostrando immunizada, tendo tido, após 4 dias de incubação, reacção febril e morrendo durante a noite de 11 para 12-III-931.

Experiencia II. - *Cobaia* 16: inoculada em 21-I-931 com 5 cc. de filtrado em vela Chamberland L3, de emulsão, em caldo glycosado (1 gr. em 10 cc.) de cerebro da cobaia 8, infectada. A cobaia não apresentou qualquer reacção febril como consequencia da inoculação do filtrado, pelo que, em 25-II-931, foi reinoculada com o virus activo (emulsão de cerebro do *S. rhesus* IV). Como consequencia, após incubação de 4 dias, teve reacção febril durante 6 dias, resistindo, porém, á infecção e permanecendo em observação durante longo tempo.

Experiencia III. - *Cobaia* 36: inoculada em 7-II-931 com 1 cc. do filtrado (em vela Mandler de 7 lbs. de pressão) de emulsão, em agua physiologica (1 gr. em 20 cc.), de cerebro da cobaia 24 (sacrificada no 6.° dia após a inoculação, 4.° da reacção, com a temperatura de 40°,6). O liquido ficou quasi todo retido, apenas pequena porção passando e com grande difficuldade. A cobaia não apresentou reacção febril, pelo que foi, em 25-II-931, reinoculada com o virus activo (emulsão de cerebro do *S. rhesus* IV), que causou, após 4 dias, uma reacção febril durante 5 dias e morte ás 12 horas de 8-III-931.

Experiencia IV. - *Cobaia* 37: inoculada em 7-II-931 com 8 cc. de filtrado (em vela Mandler de 7 lbs. de pressão) de emulsão, em caldo glycosado (1 gr. em 20 cc.), de cerebro da cobaia 24. A filtração, com este vehiculo, dá-se com relativa facilidade e em pouco tempo. Esta cobaia tambem não apresentou reacção febril, sendo reinoculada em 25-II-931 com o virus (emulsão de cerebro do *S. rhesus* IV), que determinou, após incubação de 4 dias, uma reacção febril caracteristica durante 5 dias e morte na manhã de 8-III-931.

Experiencia V - Sangue citratado da cobaia 307, colhido em 24-VII-931, no 6.° dia da inoculação e 3.° da reacção febril (40°,5) foi diluido em agua physiologica na proporção de 1:2. Immediatamente foi inoculada a cobaia 312 com 3 cc. da diluição, correspondente a 1 cc. de sangue *in natura*. Iniciou-se a filtração em vela Berkefeld N, sob pressão negativa de 40 cm. de Hg., processando-se ella com difficuldade. No fim de 2 ½ horas haviam passado 3 cc. do liquido, sendo este filtrado (correspondente a 1 cc. do sangue *in natura*) inoculado no peritoneo da cobaia 313. Na mesma occasião, isto é, decorridas 2 ½ horas após a colheita, outra cobaia, 314, foi inoculada com 3 cc. do restante do liquido que deixara de passar, afim de se assegurar si esse lapso de tempo não prejudicaria o virus e, portanto, a experiencia. Eis os resultados obtidos:

Cobaia 312: inoculada em 24-VII-931 com o sangue citratado diluido da cobaia 307, immediatamente após a colheita: reacção febril caracteristica durante 3 dias, após 2 de incubação, e morte ás 12 horas de 30-VII-931.

Cobaia 313: inoculada em 24-VII-931 com o filtrado de sangue citratado diluido da cobaia 307: não apresentou reacção alguma, tendo morrido por outra causa no fim de alguns dias. Emulsão de seu cerebro foi inoculada na cobaia 316 que, por sua vez, nenhuma reacção apresentou e nem se mostrou immunizada. Este resultado confirma a não infecção da cobaia 313 e que o virus não havia atravessado a vela.

Cobaia 314: inoculada em 24-VII-931 com sangue citratado diluido da cobaia 307, após 2 ½ horas da colheita, isto é, com o mesmo lapso de tempo que o filtrado tambem inoculado em outra cobaia: reacção febril caracteristica durante 4 dias, após 3 de incubação, e morte ás 11 horas de 1-VIII-931.

Nas experiencias com emulsão de cerebro a actividade do virus nella existente antes da filtração foi tambem verificada, como se pode vêr em protocollos já assignalados no capitulo II. Pelas experiencias descriptas verifica-se que o virus existente em emulsão de cerebro, mesmo usando como vehiculo o caldo glycosado, e no sangue, nas condições assignaladas, não atravessa as velas Chamberland L3 e L5, Mandler de 7 lbs. e Berkefeld N.

2. - Passagem através da conjunctiva ocular intacta e D.M.I. (dose minima infectante) do virus.

Certos virus atravessam, com relativa facilidade, a conjunctiva ocular e mesmo a propria pelle intacta. Procurámos, por isso, verificar esse facto com relação ao typho exanthematico de São Paulo, assim como a D. M. I. do virus, tendo obtido os seguintes resultados:

Experiencia VI - *Passagem através da conjunctiva ocular.* Em 25-III-931 collocámos uma grossa gotta de emulsão de cerebro da cobaia 129 (1 gr. do orgam para 10 cc. de agua physiologica) na conjunctiva ocular da cobaia 140. A gotta permaneceu durante cerca de 15 minutos sobre o olho do animal, mantido em posição e sendo feitos movimentos palpebraes para que a emulsão ficasse em contacto com todo o sacco conjunctival; a gotta, tendo escorrido, foi renovada uma vez. Como consequencia, não se observou qualquer reacção local e geral da cobaia. Em 22-IV-931 foi, por isto, reinoculada com o virus por via peritoneal (emulsão de cerebro da cobaia 169): após incubação de 2 dias, apresentou reacção febril caracteristica durante 9 dias, morrendo durante a noite de 3 para 4-V-931. A presença do virus, em dose infectante, nas gottas depositadas, demonstrou-se pelas experiencias seguintes referentes á sua D. M. I..

D. M. I. do virus — Varias cobaias são inoculadas por via peritoneal com o virus em varias diluições. A 1.ª considerada a 1 por 10 (sendo de facto menor) foi preparada, tomando 1 gr. de cerebro da cobaia 129 (sacrificada no 5.° dia da inoculação e 2.° da reacção febril) para 10 cc. de agua physiologica; a emulsão foi feita cuidadosamente em gral de porcelana. Desta, foram obtidas as outras diluições, usando-se, para cada uma. nova pipeta, afim de serem evitadas causas de erros na diluição do virus. Foi inoculado 1 cc. das diluições do virus a 1 por 10, 1 por 1000, 1 por 10.000 e 1 por 1.000.000.

Experiencia VII - *Cobaia* 135: inoculada em 25-III-931 em emulsão de cerebro da cobaia 129 (dil. a 1:10), por via peritoneal. Após incubação de 2 dias, apresentou reacção febril caracteristica durante 5 dias, sendo sacrificada em 1-IV-931 para novas passagens do virus.

Cobaia 141: tambem foi inoculada nas mesmas condições, porém por via subcutanea; após 4 dias, teve reacção febril durante outros 4, sendo tambem sacrificada para passagens em 2-IV-931.

Experiencia VIII - *Cobaia* 136: inoculada em 25-III-931 com emulsão de cerebro da cobaia 129, diluida a 1 por 1000. Após incubação de 5 dias, apresentou reacção febril acima de 40° durante outros 2 e amanheceu morta em 5-IV-931, 10 dias após a inoculação.

Experiencia IX - *Cobaia* 137: inoculada em 25-III-931 com emulsão de cerebro da cobaia 129, diluida a 1 por 10.000. Após incubação de 6 dias, reacção febril durante 3 dias e morte na noite de 5 para 6-IV-931, isto é, 11 dias após a inoculação.

Experiencia X - *Cobaia* 138: inoculada em 25-III-931 com emulsão diluida a 1 por 1.000.00, do cerebro da cobaia 129. Não apresentou reacção febril pelo que em 22-IV-931 foi reinoculada com o virus activo (emulsão de cerebro

cobaia 169); como consequencia, reacção febril caracteristica durante 4 dias. ós 4 de incubação, e amanheceu morta em 3-V-931.

Verifica-se pelas experiencias acima descriptas que o virus do typho exan- ematico de S. Paulo (quando em emulsão de cerebro de uma cobaia infecta-) se revelou incapaz de atravessar a conjunctiva ocular intacta de uma cobaia. ndo depositado sobre ella, nas condições descriptas, embora a quantidade do rus fosse sufficiente e bem maior do que a necessaria para provocar, por via ritoneal, a infecção deste animal. Esta ultima quantidade, isto é, a D. M. I. lose minima infectante) do virus, foi, segundo as experiencias descriptas, enor que 1 por 10.000 cc. (correspondente a 0,0001 gr. do orgam) e maior e 1 por 1.000.000 (0.000001 gr. do orgam) da diluição do virus (cerebro iectante).

- Resistencia do virus sob varias condições.

Os virus geralmente resistem, sobretudo quando em certas condições de mperatura, ao deseccamento e se conservam bem, nas mesmas condições, na ycerina pura ou diluida a 50 %. Procurámos verificar estas propriedades com lação ao virus do nosso typho, assim como sua resistencia quando no cerebro nservado em congelação.

a) *Resistencia ao deseccamento.* - A technica para o deseccamento foi a esma que utilizámos para a conservação neste estado do virus amarillico. Em- egámos, para a seccagem no vacuo e sob acido sulfurico, o sangue de um nimal infectado (cobaia e *rhesus*), colhido em reacção febril ou cerebro do nimal sacrificado em occasião favoravel e triturado em um gral, sendo a massa palhada em placas de Petri e levada ao apparelho seccador. Sendo o ma- rial virulento disposto em camada fina, a operação está terminada em menos e 24 horas, recolhendo-se o virus secco em tubos, onde tambem se faz o vacuo, chando-se, em seguida, ao maçarico e conservando-se no frigo, em tempera- ra abaixo de 0°C.

O virus assim deseccado foi inoculado em differentes periodos de tempo, esmo depois de 24 horas de conservação e os resultados são resumidos no uadro V, que segue:

QUADRO V

Resistencia do virus do typho exanthematico de São Paulo ao deseccamento no vacuo

N.º do animal	Virus secco inoculado	Dose, grs.	Dias de conser-vação	Resul-tado da inocula-ção	Observações
Cobaia 53 (18-II-31)	Cerebro da cobaia 2	0,105	29	nega-tivo	Em 20-III-31 foi reinoculada com o virus activo (emul. cer. cob. 113), tendo tido reacção febril caracteristica após 3 dias de incubação.
Cobaia 54 (18-II-31)	Sangue da cobaia 19	0,120	18	nega-tivo	Em 20-III-31 foi reinoculada com o virus activo (emul. cer. cob. 113), tendo tido in-fecção caracteristica, febre por 6 dias, após 3 de incu-bação e morte.
Cobaia 55 (18-II-31)	Sangue do *rhesus* I	0,380	7	Amanhe-ceu mor-ta em 20-II-31	A causa da morte foi perito-nite, verificada na necro-psia, não sendo este resulta-do tomado em consideração.
Cobaia 56 (19-II-31)	Cerebro do *rhesus* II	0,400	1	negativo, por não apresen-tar reac-ção fe-bril	Em 20-III-31 foi reinoculada com o virus activo (emul. cer. cob. 113). Não apresen-tou reacção febril durante longa observação, mostran-do-se, pois, immunizada.
Cobaia 62 (21-II-31)	Sangue do *rhesus* I	0,120	10	nega-tivo	Em 20-III-31 foi reinoculada com o virus activo (emul. cer. cob. 113), tendo infec-ção caracteristica após 3 dias de incubação.
Cobaia 73 (24-II-31)	Cerebro do *rhesus* II	0,400	6	nega-tivo	Em 25-III-31 foi reinoculada com o virus activo (emul. cer. cob. 129), tendo reac-ção febril caracteristica após 4 dias de incubação.

O virus dos animaes, utilizado no deseccamento, mostrou-se activo ao ser inoculado fresco, isto é, após a colheita e nas condições que já assignalámos anteriormente.

Verifica-se pelo quadro acima que o virus do typho exanthematico de São Paulo, quando no sangue ou cerebro de animaes infectados, depois de secco no vacuo, sob acido sulfurico, não resiste a uma conservação em condições favoraveis (abaixo de 0°C) por prazo superior a 24 horas. Neste prazo, 24 horas, o virus secco não provocou reacção febril, porém, a immunidade do animal, verificada 30 dias depois, em relação a nova inoculação do virus activo, podendo-se, portanto, acreditar que tenha apenas provocado uma infecção benigna. Já em 6 dias de conservação, não só não provoca reacção alguma da cobaia, como esta não se mostra mais immunizada em relação á segunda inoculação do virus activo. E' preciso notar que as doses do virus secco inoculado (em 2 experiencias de quasi ½ gramma) foram bastante elevadas si se tiver em mente a dose infectante, principalmente de cerebro fresco, como já mostrámos.

b) *Resistencia do virus na glycerina pura e na glycerina a 50%.* - Em uma nova serie de experiencias procurámos verificar a resistencia do virus na glycerina pura e na glycerina a 50 %, em condições favoraveis de temperatura (5°C), meios que, como se sabe, são empregados para a conservação de diversos virus. A glycerina utilizada foi a mesma usada no serviço de vaccina animal do Instituto (embora sua reacção tenha se mostrado acida em verificação feita posteriormente), distribuida em tubos, pura, ou diluida a 50 % com agua destillada. Introduzido o virus (pedaços de cerebro de animaes infectados, sacrificados em occasião propicia) eram os tubos lacrados e conservados no frigo. Decorridos varios periodos de tempo, pequena porção era retirada, lavada, emulsionada em agua physiologica e inoculada em cobaias para verificação da actividade.

Os resultados são resumidos no quadro VI, que segue.

QUADRO VI

Resistencia do virus em glycerina diluida a 50 %

N.º do animal e data	Virus empregado	Dias de conservação	Resultado da inoculação	Observações
Cobaia 76 (24-II-31)	Cerebro do *rhesus* II	7	Reacção febril caracteristica durante 5 dias, após uma incubação de 7 e morte ás 13 hs. de 9-III-31.	
Cobaia 77 (24-2-31)	Cerebro do *rhesus* I	12	Reacção febril, após incubação de 5 dias. Resistiu á infecção.	Em 25-III-31 foi reinoculada com o virus activo (emul. cer. cob. 129), não apresentando reacção febril e mostrando-se, pois, immunizada.
Cobaia 78 (24-II-31)	Cerebro da cobaia 19	24	negativo	Em 25-III-31 foi reinoculada com o virus (emul cer. cob. 129). Apresentou reacção febril caracteristica após 4 dias de incubação, tendo tido inflammação escrotal, com placas hemorrhagicas nos ultimos dias.
Cobaia 79 (24-II-31)	Cerebro da cobaia 8	34	negativo	Em 25-III-31 foi reinoculada com o virus (emul. cer. cob. 129), tendo tido infecção caracteristica após 4 dias de incubação. Tambem apresentou reacção escrotal com placas hemorrhagicas nos ultimos dias.

Resistencia na glycerina pura

N.º do animal e data	Virus empregado	Dias de conservação	Resultado da inoculação	Observações
Cobaia 75 (24-II-31)	Cerebro do *rhesus* II	7	negativo	Em 25-III-31 foi reinoculada com o virus (emul. cer. cob. 129). Apresentou reacção febril caracteristica, após incubação de 4 dias.

Verifica-se assim que o virus, quando no cerebro, conserva sua vitalidade em glycerina diluida a 50 % e em condições favoraveis de temperatura, durante 12 dias. Neste prazo talvez esteja já um pouco attenuado, provocando a infecção com incubação maior do que communmente. Em 7 dias, neste meio, sua actividade é igual á do orgam fresco e em 24 dias se mostrou avirulento, não provocando nem a immunidade do animal.

Na glycerina pura sua resistencia é menor, pois que em 7 dias se mostrou avirulento (o mesmo virus que, neste prazo e em glycerina a 50 %, se comportou como virus fresco), não provocando siquer a immunidade da cobaia. Neste meio não foi verificada a resistencia após menor prazo. E' possivel que melhores condições de reacção favoreçam a sobrevivencia do virus neste meio. Em todo caso estes resultados são sufficientes para mostrar que, com relação á sua conservação em glycerina pura ou diluida, o virus do typho de São Paulo não se comporta como os verdadeiros virus chamados filtraveis.

c) *Resistencia do virus á congelação.* - Finalmente, para terminar o estudo de algumas das propriedades do virus do nosso typho e que deverá ser completado pelo de muitas outras, procurámos verificar o seu comportamento com relação á congelação do orgam virulento.

Para esse fim, pedaços de cerebro de cobaia infectada eram collocados em pequenos tubos que eram simplesmente arrolhados, lacrados e conservados em congelação (-5° a -10°C). Decorrido certo numero de dias, uma pequena porção era retirada, emulsionada em agua physiologica e immediatamente inoculada em uma cobaia normal.

Os resultados até agora observados são resumidos no quadro VII, seguinte:

QUADRO VII

Resistencia do virus em congelação

N.º do animal	Virus em congelação e data	Dias de conservação	Resultado da inoculação	Observações
Cobaia 219 (14-V-31)	Cerebro cob. 201 (12-V-31)	2	Reacção febril caracteristica durante 4 dias, após incubação de 4 dias e morte durante a noite de 23 para 24-V-931.	
Cobaia 220 (14-V-31)	Cerebro cob. 19 (6-V-31)	8	Reacção febril caracteristica durante 4 dias após 3 de incubação e morte na noite de 21 para 22-V-931.	
Cobaia 221 (14-V-31)	Cerebro cob. 182 (29-IV-31)	15	Reacção febril caracteristica durante 3 dias após 3 de incubação e morte pela manhã de 22-V-31.	
Cobaia 222 (14-V-31)	Cerebro cob. 112 (18-IV-31)	26	Reacção febril typica durante 7 dias, após 3 de incubação e morte na noite de 25 para 26-V-931.	
Cobaia 223 (14-V-31)	Cerebro cob. 141 (2-IV-31)	42	Reacção febril caracteristica durante 5 dias, após 4 de incubação e morte na noite de 23 para 24-V-931.	
Cobaia 261 (22-VI-31)	Cerebro cob. 135 (1-IV-31)	82	Não apresentou reacção caracteristica, mostrando-se negativo o resultado da inoculação.	Foi reinoculada com o virus activo (em cer. cob. 275), em 14-VII-31; após 2 dias de incubação, apresentou reacção caracteristica durante 4 dias e morreu na manhã de 23-VII-31.

Verifica-se por estes resultados que o virus do typho exanthematico de São Paulo no orgam (cerebro) em congelação manteve sua vitalidade e virulencia durante um periodo de tempo superior a 42 dias e inferior, numa experiencia, a 82 dias. O prazo exacto precisa ser ainda verificado por maior porcentagem de cerebros infectantes, o que presentemente está sendo feito (*).

Esta verificação é de interesse pratico, pois facilita e torna mais economica a conservação do virus no laboratorio e mostra um meio pelo qual poderá elle ser transportado, em viagens mesmo longas, sem perda da sua virulencia.

4. - Discussão e resumo.

Embora considerado como pertencente ao grupo de infecções causadas pelos chamados "virus filtraveis", o typho em suas varias modalidades apresenta certas particularidades pelas quaes se evidenciam differenças que auctorizam sua inclusão em um grupo á parte. Em primeiro logar se collocam suas relações, de causa e effeito, com as rickettsias, embora ainda não tenha sido dita a ultima palavra sobre estes elementos, sua biologia, evolução, etc.; em seguida, certas propriedades do "virus" do typho não correspondem perfeitamente ás dos virus verdadeiros. Procurámos estudar, em relação ao "virus" do typho exanthematico de São Paulo, algumas destas propriedades, entre as quaes a sua filtrabilidade, passagem através das mucosas e D. M. I., resistencia ao deseccamento, á acção da glycerina pura ou diluida e resistencia á congelação.

Em relação á filtrabilidade, verificámos que o virus, quando no orgam (cerebro) virulento, diluido em agua physiologica ou em caldo glycosado, meio que favorece a filtrabilidade do virus vaccinico, segundo verificámos juntamente com R. Godinho (29), assim como no sangue virulento diluido, não atravessa as velas Chamberland L3 e L5 e as velas diatomaceas Mandler, de 7 lbs. e Berkefeld N.

Estes resultados concordam com os de muitos auctores, como Ricketts e Wilder (30), Olitsky (31), Zinsser e Batchelder (32) e mostram que o agente do typho não pode ser considerado filtravel, como, em identicas condições, acontece, por exemplo, com o virus do herpes e o da vaccina, segundo verificaram os dois ultimos auctores. Alguns resultados duvidosos de filtração assignalados por Nicolle, Conor e Conseil (33) e alguns positivos de Nicolle e Labailly (34) fazem pensar que o agente seja menor do que as bacterias communs ou tenha phases em que o é, podendo ás vezes atravessar certos filtros, mas que são maiores do que os verdadeiros virus filtraveis. Isto se justifica pelo que já se conhece sobre o pleomorphismo, tamanho e outras particularidades das rickettsias.

(*) Em experiencias posteriores, verificámos que o virus se mantem virulento, nas condições assignaladas (em congelação, em frio secco) no fim de quasi 1 anno, quando ainda provocou, numa experiencia, reacção ligeira, após incubação mais longa.

Outro facto que se observa geralmente com os virus é sua passagem através da mucosa ocular intacta, o que, em uma experiencia, não conseguimos com o virus do nosso typho, apesar de que sua concentração no material depositado na mucosa ocular era sufficiente para provocar, por outra via, a infecção. Isto se evidenciou pela determinação da D. M. I. (dose minima infectante) que correspondeu a uma diluição superior a 1/10.000 e inferior a 1/1.000.000 da emulsão cerebral. Sparrow e Lombroso (35) conseguiram, em algumas experiencias, infectar cobaias com o virus do typho classico através da mucosa nasal, principalmente repetindo as applicações, e obtiveram resultados inconstantes e duvidosos por via conjunctival, sendo que nos casos considerados positivos a infecção era attenuada, com longa incubação e fraca elevação thermica e não seguida sempre de immunidade do animal.

Em relação a outra propriedade que estudámos, a resistencia ao deseccamento, é um facto geralmente verificado com os virus verdadeiros e, nestes ultimos annos, ficou bem estabelecido para o da febre amarella que, desta forma, no vacuo e em baixa temperatura, se conserva por longo tempo, e era já conhecida em relação ao virus vaccinico, ao da encephalomyelite enzootica (doença de Borna), etc.. O ultimo, segundo verificação de Nicolau e collaboradores (36) se conserva em estado secco, mesmo com temperatura de 16° a 20°C e não ao abrigo da luz, pelo menos durante 373 dias.

A nossa verificação neste sentido, em relação ao virus do typho de São Paulo, apresenta certa importancia epidemiologica, pois, não resistindo elle por alguns dias ao deseccamento, quando, por exemplo, se acha nas fezes de hematosugadores (piolhos, percevejos, carrapatos, etc.), a sua transmissão por esse meio através da pelle sã ou com erosões não é provavel que se dê, ao contrario do que já foi verificado experimentalmente em relação ao virus amarillico quando nas fezes de *Aëdes aegypti* (37) e *Cimex lectularius* (38) infectados, a não ser que na sua phase de rickettsia, encontrada no transmissor habitual, sua resistencia ao deseccamento seja maior.

A outra propriedade estudada que possuem os virus quando, especialmente em condições favoraveis de temperatura, foi a resistencia á glycerina pura ou diluida a 50 % Estes meios são utilizados para a conservação de certos virus. A este respeito verificámos que o virus do typho exanthematico de São Paulo quando no cerebro infectante e em condições favoraveis de temperatura (5°C) não resiste durante 7 dias na glycerina pura e que na glycerina diluida a 50% com agua destillada conserva sua virulencia durante 12 dias (reacção febril característica após incubação um pouco mais longa, de 5 dias, e immunidade do animal), estando destruido em 24 dias e, muito provavelmente, antes deste prazo verificado. Esta verificação deve, em todo caso, ser repetida com glycerina em melhores condições de reacção.

Finalmente, em relação á sua vitalidade no organ (cerebro) mantido em

congelação, verificámos que o virus do typho de São Paulo resiste durante um prazo de cerca de 1 anno, segundo verificação posterior ás experiencias citadas.

Este facto apresenta interesse pratico, pois a congelação do cerebro infectante (simplesmente collocado num frasco ou tubo arrolhado e em temperatura de -5° a -10° C) torna mais economica a conservação do virus no laboratorio, dispensando as passagens successivas em animaes, e indica um meio pelo qual poderá ser transportado a grandes distancias, sem perda da sua virulencia.

São estas algumas caracteristicas do virus do typho exanthematico de São Paulo, devendo ser continuado o estudo de outras das suas propriedades (*).

5. - Conclusões.

I. O virus do typho exanthematico de São Paulo, quando no sangue citratado ou no cerebro emulsionado em agua physiologica ou caldo glycosado, nas condições experimentaes assignaladas neste trabalho, não passa através das velas Chamberland L3 e L5, Mandler de 7 lbs. e Berkefeld N.

II. Não conseguimos infectar a cobaia pela deposição do virus (emulsão de cerebro) na mucosa ocular intacta, embora no material depositado sua concentração fosse sufficiente para provocar, por outra via, a infecção.

III. A D. M. I. (dose minima infectante) do virus correspondeu a uma diluição superior a 1 por 10.000 e inferior a 1 por 1.000.000 da emulsão cerebral.

IV. Quando secco no vacuo, sob acido sulfurico e conservado tambem no vacuo e em temperatura inferior a 0°C, o virus (sangue ou cerebro) perde sua vitalidade em prazo pouco superior a 24 horas, quando apenas provocou infecção benigna e immunidade do animal; em 6 dias já se achava destruido, não provocando siquer immunidade.

V. Em glycerina diluida a 50% e em temperatura de 5°C o virus (no cerebro) apresenta vitalidade e virulencia no 12.° dia e não no 24.° dia.

VI. Nas mesmas condições, porém em glycerina pura, já havia perdido sua actividade em 7 dias.

VII. Quando no orgam (cerebro) congelado, o virus do typho exanthematico de São Paulo conserva sua vitalidade e virulencia por cerca de 1 anno.

(*) Com a collaboração do distincto collega D. von Klobusitzky, tivemos opportunidade de realizar tambem algumas experiencias de cataphorese com o virus do nosso typho. Estes resultados serão descriptos em outro trabalho. Diremos apenas que em soluto tampão neutro (pH = 6,967) e após 2 horas de corrente o virus passa para o polo negativo, sendo, portanto, de carga electrica positiva. As experiencias com emulsão do virus em tampões acidos e alcalinos e consequente marcha do virus para o cathodo e anodo serão descriptas com pormenor no trabalho assignalado

VIII. A congelação do cerebro virulento é, em virtude da conclusão acima, um meio favoravel para o transporte do virus e, sob o ponto de vista pratico, torna mais economica sua conservação no laboratorio, por trazer uma reducção do numero de animaes necessarios para sua manutenção por passagens successivas.

Capitulo VI

Febres exanthematicas
Estudos comparativos, em relação á cobaia, de amostras do virus do typho classico do velho mundo, typho endemico da America do Norte e typho exanthematico de São Paulo

O conceito sobre a diversidade da infecção exanthematica no velho e no novo mundo soffreu ultimamente certas modificações, sendo a primeira considerada como a forma epidemica, transmittida pelo piolho e tendo o homem como depositario do virus e a segunda como a forma endemica, transmittida pela pulga e tendo como depositario do virus na natureza o rato.

O proprio Mooser (39) modificou alguns dos seus pontos de vista anteriormente emittidos e pensa que o virus responsavel pelo typho exanthematico classico tem tambem uma origem murina e que sua passagem prolongada pela pulga e sobretudo pela pulga transferida de rato a rato faz com que adquira as propriedades do virus americano, isto é, da forma endemica. Por outro lado, o virus responsavel por esta forma (virus americano) augmenta sua virulencia pela passagem prolongada pelo piolho-homem, dando a forma epidemica com as caracteristicas do virus do typho do velho mundo.

Esta supposição, que Mooser pensa ter verificado experimentalmente, pareceria encontrar confirmação nos resultados obtidos por diversos auctores no velho continente, em virtude do isolamento, em pulgas e ratos de certos lugares (Athenas, Pireu, Toulon e mesmo Paris), de amostras de virus com os caracteres experimentaes do typho endemico ou americano (Lepine, Mercandier e Pirot, Caminopetros e Pangalos, Brumpt).

Apezar destas possibilidades, achamos que se deve manter a diversidade das duas variedades, tanto sob o ponto de vista scientifico, por apresentarem differenças clinicas, experimentaes e epidemiologicas, como sob o ponto de vista pratico para o estabelecimento das medidas de prophylaxia adequadas a cada uma. Este modo de pensar ainda se justifica pelo que se sabe hoje sobre as mutações e variações microbianas em geral. No caso do typho exanthematico, a passagem prolongada por novo transmissor e depositario daria á rickettsia responsavel novas propriedades, modificando-lhe a biologia e individualizando, assim, a forma resultante, causadora da nova forma da infecção.

São numerosos na microbiologia os exemplos desta natureza e mesmo entre os virus verdadeiros é conhecida a mudança da biologia e propriedades do virus variolico pela passagem em especies animaes diversas, dando entre outros o virus vaccinico. Ambos apresentam affinidades, demonstradas pelas provas de immunidade cruzada e de reversão, pela passagem prolongada do virus variolico em vitellos. Sob o ponto de vista scientifico e pratico, porém, a diversidade de ambos está estabelecida enquanto a propria identidade ainda não é acceita por todos os experimentadores.

Os conhecimentos das relações variolo-vaccina poderão ser applicados aos das do typho exanthematico do velho mundo (epidemico) e do typho americano (endemico).

O typho endemico, igualmente verificado em outras regiões além da America, ainda se distinguiria do typho murino (enzootico nos ratos) e que póde ser tambem, pelas pulgas, transmittido ao homem, provocando uma infecção benigna (doença de Brill, typho nautico, febre marselhesa).

Ao lado deste primeiro grupo, que tem por typo o typho epidemico, classico, do velho mundo, temos o segundo, cuja infecção typo é a febre maculosa das Montanhas Rochosas e onde se encontram a febre botonosa, o typho de S. Paulo, a tick-bite-fever, etc.; e finalmente, consideramos um terceiro grupo, cuja infecção typo é a "tsutsugamushi" e cujos transmissores são larvas de certos trombidiideos.

Este ponto de vista é o que adoptamos no momento, por considerarmos que melhor corresponde aos resultados de estudos feitos ultimamente em differentes países.

Como complemento da primeira parte deste trabalho sobre o typho exanthematico de São Paulo, resumiremos, no quadro seguinte, uma serie de caracteres que apresenta, relativamente á cobaia, o respectivo virus, comparativamente com amostras de virus do typho exanthematico classico europeu (amostras Wolbach e Breil) e do typho endemico da America do Norte (amostras Mooser e Maxcy).

Os dados referentes aos dois ultimos foram retirados de trabalhos de diversos auctores que se têm occupado do assumpto e os relativos ao typho de São Paulo, dos nossos estudos pessoaes assignalados no presente trabalho.

Além destas differenças quanto ao comportamento experimental na cobaia, outras existem relativamente á histologia pathologica e epidemiologia destas diversas formas. Quanto a este ultimo aspecto, póde-se considerar como estabelecido que o typho do velho mundo, epidemico, é transmittido pelo piolho; o typho americano, endemico, pela pulga e o typho de São Paulo, muito provavelmente pelo carrapato *Amblyomma cajennense*, segundo nossos estudos experimentaes (40) e certas observações clinicas e epidemiologicas de J. T. Piza.

Eis o quadro relativo ao comportamento na cobaia (Quadro VIII):

QUADRO VIII

Estudo comparativo do comportamento, em relação á cobaia, de amostras de virus do typho classico europeu (Wolbach e Breil), typho endemico da America do Norte (Mooser e Maxcy) e typho exanthematico de S. Paulo

Caracteres	Typho exanthematico da Europa		Typho endemico da America do Norte		Typho exanthematico de S. Paulo (zona rural ou suburbana)
	Amostra Breil	Amostra Wolbach	Mexico: Amostra Mooser	Estados Unidos: Amostra Maxcy	
Periodo de incubação	De 5-7 dias, chegando a 21 dias com as doses pequenas.	De 7-10 dias, até 21 dias. Por injecção do exsudato da vaginal se reduz a 5 dias.	De 2-19 dias, dependendo da dose. Medias de 6, 9 e 7, 7 dias (Maxcy).		De 2-5 dias, muito raramente maior
Periodo de reacção febril	De 6 a 13 dias		Media de 7, 1 e 6, 2 dias (Maxcy).		Media de 1 a 5 dias.
Evolução da infecção	Mortes raras.		Mortes raras.		Mortalidade de cerca de 70 % dos animaes.
Inflammação escrotal após inoculação peritoneal.	Nunca observada definitivamente.	Rara. Periodica. Transitoria (6 a 24 horas). Pode ser provocada por passagem pelo rato.	Praticamente constante.		Em cerca de 20 a 25 % dos animaes; muitas vezes com phenomenos hemorrhagicos. Periodica.
Exsudato na vaginal após inoculação peritoneal.	Frequente no fim do periodo de incubação. Nunca abundante.	Quasi sempre no fim do periodo de incubação. Muitas vezes abundante.	Sempre abundante.		A's vezes observado. Nunca abundante.

Adherencias do testiculo	Temporarias, raras. Nunca permanentes.	Temporarias, raras A's vezes permanentes.	Usualmente permanentes.	Raras. Ás vezes permanentes.
Cellulas com rickettsias no exsudato da vaginal e na tunica.	Encontradas ás vezes em muito pequeno numero.	Poucas ou muitas, dependendo da quantidade do exsudato.	Numerosas em todos os casos.	Raramente encontradas em muito pequeno numero.
Exsudato fibrinoso peri-esplenico.	Frequente.	Em 60 % dos casos	Occasionalmente.	Occasionalmente.
Cellulas com rickettsias no exsudato do baço.	Raras.	Raras.	Raras	Raras.
Exsudato peritoneal.	—	—	—	Ás vezes observado.
Cellulas com rickettsias no exsudato peritoneal	—	—	—	Frequentes, conforme o periodo.
Cellulas com rickettsias na parede peritoneal.	—	—	—	Geralmente observadas, ás vezes numerosas, dependendo do periodo da pesquisa.
Lesões cerebraes.	Constantes e usualmente numerosas.		Frequentes em cobaias femeas. Nos machos somente após injecção por via subcutanea (Zinsser).	Não observadas ou só muito raramente, sendo necessario verificar-se a influencia do sexo e via de inoculação.

RESUMO E CONCLUSÕES DA 1.ª PARTE

A 1.ª parte deste trabalho, que reune os resultados que obtivemos até agora com o estudo experimental do typho exanthematico de São Paulo, está dividido em 5 capitulos, abrangendo cada um determinada serie de pesquisas.

No capitulo I, como introducção, fizemos considerações geraes sobre as diversas modalidades da infecção do grupo do "typhus" ou das chamadas "febres exanthematicas", principalmente as encontradas no continente americano.

Mostrámos as formas encontradas no hemispherio norte, onde têm sido bastante estudadas (typho classico, typho endemico da America do Norte, tambem denominado typho mexicano ou tobardillo, e febre maculosa das Montanhas Rochosas) e os principaes caracteristicos que as distinguem entre si. Com relação ao hemispherio sul, fizemos considerações sobre as formas do typho endemico já assignaladas principalmente no norte da Argentina, Chile e Perú, mostrando as suas possiveis relações com o typho endemico da America do Norte, assim como com as varias outras formas do typho já estudadas em outras partes do mundo, especialmente sob o ponto de vista de suas relações sorologicas.

Assignalámos, finalmente, a nova modalidade que appareceu em S. Paulo e cujos primeiros casos foram diagnosticados em 1929. Trata-se de uma infecção provavelmente autochtona, distinguindo-se do typho classico pelo seu aspecto clinico, epidemiologico e pelo comportamento experimental do virus causador. Julgamos de grande importancia proceder-se ao estudo das suas relações com as formas do typho endemico já conhecidas nas Americas do Norte e do Sul e da sua possivel existencia em outras regiões do nosso territorio e em outros paises do continente americano, bem como verificar si se trata, como parece, de uma modalidade morbida nova ou, então, si poderá ser identificada com alguma forma do typho endemico já descripta, ou com a infecção estudada nos Estados Unidos por Badger, Dyer e Rumreich e que estes auctores consideram muito affim e, conforme verificaram ultimamente, identica á febre maculosa das Montanhas Rochosas, embora o nosso typho apresente certos caracteres differenciaes.

Os casos confirmados e registados em São Paulo desde 1929 até agosto de 1931 foram em numero de 44, com uma mortalidade de 77,2%, sendo muito provavel que esse numero seja na realidade muito maior e que, mesmo antes daquella epoca, o mal existisse, embora não diagnosticado convenientemente. Quanto ao possivel transmissor intermediario da infecção, mostrámos que poderia acreditar no papel de certos acarianos que, além dos piolhos, estão sendo estudados no Instituto, e em outros possiveis vectores, entre os quaes

certos Ixodideos, Cimicideos e Pulicideos, assim como na possibilidade da existencia de depositarios do virus entre os roedores silvestres (ratos e preás). Em outros trabalhos referentes a estes assumptos ficou experimentalmente evidenciado que o carrapato, principalmente o *Amblyomma cajennense*, pode ser responsabilizado como transmissor da infecção.

A zona de expansão e o aspecto epidemiologico do mal, assim como seu aspecto clinico com a elevada mortalidade, dão ao typho exanthematico de São Paulo um caracter proprio que o distingue do typho classico, caracter este que mais se accentúa com o estudo do comportamento experimental do virus.

O capitulo II refere-se ao comportamento experimental do virus em relação aos pequenos animaes de laboratorio (cobaia, coelho, rato, etc.).

Em relação á cobaia, que é o animal de escolha para estudos experimentaes, o virus do typho de São Paulo mostra-se bastante pathogeno, provocando a morte de cerca de 70% dos exemplares inoculados, os quaes apresentam, após um certo periodo de incubação, em media de 3 a 4 dias, uma reacção febril caracteristica que dura de 4 a 8 dias. As cobaias machos inoculadas no peritoneo com o virus, apresentam, em proporção de cerca de 20 a 25%, uma reacção inflammatoria escrotal, podendo-se observar phenomenos hemorrhagicos (petechias e placas hemorrhagicas) nas reacções mais intensas. Estes phenomenos hemorrhagicos, dando uma coloração arroxeada ao tegumento, são observados muitas vezes tambem em certas partes glabras (patas principalmente), no ultimo periodo da infecção e são, então, muito evidentes logo após a morte.

Os coelhos apresentam reacção febril durante varios dias, após curta incubação, não sendo nelles, geralmente, a infecção mortal.

Nos ratos, verifica-se geralmente uma infecção inapparente.

Considerando, embora, o typho exanthematico de São Paulo uma modalidade do grupo do "typhus", mostrámos e discutimos suas possiveis relações com outras modalidades de infecções do mesmo grupo, principalmente com o typho endemico do norte (typho mexicano e do sul dos Estados Unidos) e a febre maculosa das Montanhas Rochosas.

O capitulo III refere-se ao comportamento experimental do virus em relação a certos simios, para os quaes se mostra bastante pathogenico.

Estudámos este comportamento em relação a simios pertencentes a 3 generos (*Silenus*, *Cebus* e *Alouatta*). Quanto aos dois ultimos, embora ficasse evidente a sua sensibilidade, somente a inoculação de maior numero de exemplares permittirá juizo seguro. Os *Silenus rhesus*, apenas com uma excepção (devida provavelmente a uma infecção inapparente), succumbiram á inoculação do virus. Como consequencia desta, observa-se, decorridos 2 a 4 dias de incubação, um periodo de reacção febril caracteristica, de 4 dias geralmente, dando-se então o collapso e a morte do animal. A's vezes a infecção apresenta

um caracter mais grave, verificando-se em certas partes do corpo phenomenos hemorrhagicos mais evidentes no ultimo dia e após a morte (partes glabras, face, escroto, etc).

O capitulo IV mostra os resultados do comportamento experimental do virus como consequencia da sua inoculação na camara anterior do olho dos animaes (cobaia, coelho e *Silenus rhesus*). Verificámos a este respeito que determina uma reacção ocular caracteristica e reacção geral, febril, semelhante á provocada por sua inoculação por via peritoneal; estas reacções são especificas da infecção pelo virus, em virtude dos resultados das passagens obtidos pela inoculação de sangue ou emulsão de cerebro das cobaias infectadas por via ocular e da immunidade dos animaes que resistiam á reinoculação do mesmo virus pelas outras vias, virus que póde ser transmittido em serie por via ocular, utilizando-se para a inoculação o humor aquoso de um animal anteriormente injectado por essa via.

O capitulo V mostra os resultados dos nossos estudos sobre algumas das propriedades do virus, entre as quaes sua filtrabilidade, passagem através da mucosa ocular e dose minima infectante, resistencia ao deseccamento, á acção da glycerina e em congelação.

Os resultados obtidos foram commentados no texto e podem ser resumidos nas seguintes conclusões:

O virus do typho exanthematico de São Paulo, quando no sangue citratado ou no cerebro emulsionado em agua physiologica ou em caldo glycosado, nas condições experimentaes assignaladas neste trabalho, não passa através das velas Chamberland L3 e L5, Mandler de 7 lbs. e Berkefeld N;

não conseguimos infectar a cobaia pela deposição do virus (emulsão de cerebro) na mucosa ocular intacta, embora no material depositado sua concentração fosse sufficiente para provocar, por outra via, a infecção;

a D. M. I. (dose minima infectante) do virus correspondeu a uma diluição superior a 1 por 10.000 e inferior a 1 por 1.000.000 da emulsão cerebral;

quando secco no vacuo, sobre acido sulfurico e conservado tambem no vacuo e em temperatura inferior a 0°C, o virus (sangue ou cerebro) perde sua vitalidade em prazo pouco superior a 24 horas, quando apenas provocou infecção benigna e immunidade do animal; em 6 dias já se achava destruido, não provocando siquer immunidade;

em glycerina diluida a 50% e em temperatura de 5°C o virus (no cerebro) apresenta vitalidade e virulencia no 12.° dia e não no 24.° dia;

nas mesmas condições, porém em glycerina pura, já havia perdido sua actividade em 7 dias;

quando no organ (cerebro) congelado, o virus do typho de São Paulo conserva sua vitalidade e virulencia por cerca de 1 anno;

a congelação do cerebro virulento é, em virtude da conclusão acima, um meio favoravel para o transporte do virus e, sob o ponto de vista pratico, torna mais economica sua conservação no laboratorio, por trazer uma reducção do numero de animaes necessarios para sua manutenção por passagens successivas.

Finalmente, no capitulo VI, resumimos, num quadro, o estudo comparativo, relativamente á cobaia, de amostras dos virus do typho exanthematico classico europeu (amostras Wolbach e Breil), typho endemico da America do Norte (amostra Mooser e Maxcy) e do typho exanthematico de São Paulo, no qual se poderá vêr rapidamente uma serie de caracteres differenciaes entre elles. Assignalámos tambem o conceito que adoptamos relativamente ás "febres exanthematicas", que são separadas em 3 grandes grupos, aos quaes filiamos certas formas, bem estudadas, dessas infecções.

O estudo das propriedades do virus do typho de São Paulo deve ser continuado, assim como estudados novos aspectos resultantes da infecção experimental.

614.526:614.47

ESTUDOS
SOBRE O TYPHO EXANTHEMATICO DE SÃO PAULO

2.ª PARTE

A *Rickettsia brasiliensis* e suas relações com a infecção

Capitulo VII

Introducção: Rickettsioses e seu conceito pluralista. A rickettsia do typho exanthematico de São Paulo

O grupo de infecções representado pelas chamadas "febres typho-exanthematicas" ou "typhus" merece, no estado actual dos nossos conhecimentos, ser desligado do das infecções causadas pelos verdadeiros virus, para constituir um grupo autonomo. Isto se justifica pelo facto de o virus do "typhus" (de um modo geral), quando no sangue ou nos organs (cerebro) dos doentes ou animaes infectados, não apresentar, como vimos, todos os caracteres essenciaes dos verdadeiros virus filtraveis, dos quaes sem duvida differem em muitos pontos os microorganismos do genero *Rickettsia*, cujas relações etiologicas com varias infecções daquelle grupo são geralmente admittidas hoje em dia. Portanto, não se trataria, naquelle caso, de "virus", porém da existencia, no meio circulante e nos organs, do agente infectuoso sob uma forma, talvez granular, como alguns acreditam, e que representaria uma phase da evolução das rickettsias, facilmente visiveis e encontradas em outras condições.

Por outro lado, o facto de não ter sido possivel cultivarem-se artificialmente as rickettsias de um modo pratico, a não ser em meio de tecidos (*), o

(*) Os trabalhos relativos á multiplicação das rickettsias em culturas de tecidos, principalmente os realizados ultimamente, têm fornecido elementos valiosos, assim ao melhor conhecimento da biologia, como da differenciação das varias especies. Dentre esses tra-

que não permitte, por enquanto, sua utilização, segundo os processos bacteriologicos communs, para o estudo da biologia, acção sobre hydrocarbonatos, etc., vem difficultando a differenciação biologica destes microorganismos e sua classificação de accordo com a nomenclatura bacteriologica.

Enquanto isto não acontece, sua distincção systematica sómente poderá ser tentada pelo estudo do comportamento em relação aos animaes sensiveis, a syndrome clinica que determinam no homem, os meios de sua transmissão e conservação na natureza ou, melhor, pelo estudo epidemiologico das formas de infecção pelas quaes são responsaveis.

Baseado nestes elementos, é já possivel fazer-se uma distincção entre as rickettsias responsaveis pelas varias infecções do grupo do "typhus", embora certas modalidades clinicas apresentem relações immunologicas e alguns caracteres communs, que indicam a mesma origem primitiva. E' o que acontece com o typho exanthematico classico, do velho mundo, e o typho endemico na America do Norte (Mexico e Estados Unidos), para os quaes a dualidade foi já admittida por alguns e parece justificar-se pelo que se conhece dos estudos classicos sobre o typho do velho mundo e pelos dos auctores que trabalham na America do Norte (Mooser, Maxcy, Zinsser, Castaneda, etc.), sobre o typho endemico no continente septentrional, no que diz respeito principalmente ao comportamento experimental dos virus, localização e frequencia das rickettsias e epidemiologia das infecções.

Julgamos que, mesmo assim, o conceito dualista em relação ás infecções do grupo do "typhus" é ainda restricto. A este grupo pertencem, sem duvida, outras infecções que se devem distinguir, pelos elementos assignalados e por outros, das duas modalidades mencionadas. E' o que acontece com a febre maculosa das Montanhas Rochosas, com a febre marselhesa, com a febre bo-

---

balhos devemos assignalar apenas os publicados mais recentemente por Pinkerton e Hass (J. Exp. Med. LIV (3): 307. 1931; LVI (1): 131. 1932; LVI (1): 145. 1932 et LVI (1): 151. 1932) e de Nigg e Landsteiner (J. Exp Med. LV (4): 563. 1932).

A localização das rickettsias nas cellulas mesotheliaes dos animaes e a que se verifica nas cellulas dos tecidos em cultura *in vitro* mostram certas differenças segundo o grupo de infecções que occasionam. Assim as rickettsias do typho epidemico (*Rickettsia prowazeki*) e a do typho endemico (corpusculos de Mooser ou *Rickettsia mooseri*) somente se localizam, tanto nas culturas de tecidos, quanto nas cellulas mesotheliaes *in vivo*, no cytoplasma cellular; a rickettsia da febre maculosa das Montanhas Rochosas (*Rickettsia rickettsi*) e a de certas infecções affins (febre maculosa, typho leste, de Minnesota), nas culturas de tecidos, embora encontradas tambem no cytoplasma, têm uma apparente predilecção pelos nucleos das cellulas (Pinkerton e Hass).

Relativamente á rickettsia do typho de São Paulo (*Rickettsia brasiliensis*), já iniciámos uma série de experiencias para sua cultura em tecidos *in vitro*, afim de verificar si, nestas condições, ella apresenta tambem predilecção nuclear, ao contrario do que acontece *in vivo*, nas cellulas mesotheliaes da parede peritoneal da cobaia.

tonosa de Tunis, com a tsutsugamushi e tambem com o typho exanthematico de São Paulo, para somente citar algumas que apresentam distincções mais evidentes quanto ao comportamento experimental, presença e localização de rickettsias e aspecto epidemiologico.

Como nenhuma concepção é definitiva em biologia, na justa expressão de Nicolle e Sparrow (41), parece-nos razoavel que se torne *pluralista* o conceito sobre este grupo de infecções, que se convencionou chamar "typhus", mas que melhor se denominaria de "rickettsioses", pois que a presença de formas dos microorganismos primeiramente estudados por H. da Rocha Lima na infecção typo, o typho exanthematico do velho mundo, constitue elemento de distincção já estabelecido em relação a algumas formas clinicas e que provavelmente ainda será assignalado em outras infecções do mesmo grupo.

Relativamente ao typho exanthematico de S. Paulo, embora não se possa ainda concluir em definitivo, parecem maiores suas relações com o grupo da febre maculosa das Montanhas Rochosas, constituindo, talvez, uma nova modalidade da infecção, em virtude do comportamento experimental do "virus" e outros caracteres já assignalados (42) e estudados na 1.ª parte deste trabalho, como pela localização das rickettsias nos animaes infectados, pela diversidade do transmissor intermediario e, finalmente, por constituir o seu virus, segundo A. Felix, uma nova variedade sorologica.

Assim sendo, até que novos estudos sejam emprehendidos, os "corpusculos de Mooser", que melhor se denominariam *Rickettsia mooseri*, como homenagem ao illustre pesquisador que tão bem os estudou no typho mexicano, deverão considerar-se distinctos da *Rickettsia brasiliensis*, responsavel pelo typho exanthematico de S. Paulo. O mesmo poder-se-á dizer, embora maiores suas affinidades, em relação á *Rickettsia* (*Dermacentroxenus*) *rickettsi* Wolbach, responsavel pela rickettsiose das Montanhas Rochosas, assim como em relação ás outras especies descriptas, pertencentes ao genero creado pelo prof. Rocha Lima (43) e responsaveis por outras rickettsioses.

Exposto assim o nosso modo de pensar sobre este importante problema da pathologia, passaremos aos resultados das nossas pesquisas sobre a presença e localização da *Rickettsia* que descrevemos no typho exanthematico de S. Paulo e das suas relações com a infecção.

Um estudo geral das differentes rickettsias já descriptas e estudadas justificar-se-ia, talvez, mas o consideramos desnecessario, pois mais proveitoso será para o leitor interessado recorrer aos estudos já feitos a respeito, principalmente no trabalho de Wolbach e ao de Rocha Lima (44), onde, no ultimo, são estudadas de um modo geral as differentes especies conhecidas até então, mais particularmente a especie typo, a *Rickettsia prowazeki*.

*

* *

Estudando a *Rickettsia manchuriae*, como causadora do chamado typho da Manchuria, e sua localização nas cellulas epitheliaes do estomago das pulgas, os auctores japoneses Kodama, Kono e Takahashi (45) fizeram, recentemente, algumas considerações sobre as relações entre o typho epidemico, classico, do velho mundo e o typho endemico, principalmente conhecido no Mexico e Estados Unidos e estudado tambem em outras regiões. Esse trabalho, em sua traducção inglesa publicada, é confuso em certos pontos. Em todo caso, os auctores consideram o typho manchuriano distincto do typho genuino e identico ao typho endemico mexicano e ao typho brasileiro, achando que sua distincção repousa principalmente na differença de transmissor entre as duas modalidades.

Si, por certos aspectos (relações antigenicas do grupo) dessas infecções, typho exanthematico classico (epidemico) e typho endemico, se pode pensar que possuem uma mesma origem primitiva, o simples facto da diversidade de transmissor justifica uma distincção, igualmente apoiada pelo comportamento experimental dos respectivos virus. Nestas condições, as rickettsias responsaveis seriam distinctas, como as consideramos no texto.

A confusão dos auctores japoneses surge igualmente ao ligarem ao typho endemico da America do Norte o typho exanthematico de S. Paulo, que elles mencionam como typho brasileiro, ligação talvez originada pelo facto de esses auctores desconhecerem os outros trabalhos nossos, referentes ao comportamento experimental do virus e transmissibilidade da infecção brasileira. Por estes aspectos e por outros dados já conhecidos de observação clinica (J. T. Piza), histo-pathologicos (J. R. Meyer) e epidemiologicos, o typho de S. Paulo não deve ser confundido com o typho endemico (Mexico, Estados Unidos, Manchuria, etc.), permanecendo como modalidade á parte, talvez mais relacionada com a febre maculosa das Montanhas Rochosas, da qual, no entanto, se distingue em muitos aspectos.

O typho exanthematico de S. Paulo não é transmittido pelo piolho ou pela pulga, porém, com bastante evidencia, pelo carrapato (*Amblyomma cajennense*), como assignalámos em paginas seguintes deste trabalho e em outros já publicados ou em vias de publicação.

Nestas condições, a sua rickettsia, por nós descripta como *Rickettsia brasiliensis*, distinguir-se-á, como especie á parte, da rickettsia responsavel pelo typho endemico (*corpusculos de Mooser*, que chamamos de *Rickettsia mooseri* da qual seria synonymo a *Rickettsia manchuriae*, dos auctores japoneses), assim como da responsavel pelo typho classico (*Rickettsia prowazeki*) ou da causadora da febre maculosa das Montanhas Rochosas (*Rickettsia rickettsi*).

A rickettsia do typho exanthematico de São Paulo

Desde que iniciámos, em principio de 1931, estudos experimentaes sobre a modalidade do "typhus" que surgiu na capital de S. Paulo, as nossas vistas se dirigiram para a pesquisa de rickettsias nos animaes (cobaias) inoculados com o virus (sangue ou emulsão de cerebro de animaes infectados). Assignalando logo de inicio a reacção escrotal em muitos animaes, as nossas experiencias, muito naturalmente, se orientaram para a pesquisa nas cellulas da tunica vaginal do testiculo. Estas pesquisas iniciaes, feitas em condições optimas muitas vezes, ao contrario do que occorre com o "tobardillo", foram geralmente negativas. Iniciámos, então, concomitantemente, a mesma pesquisa nas cellulas da parede parietal do peritoneo, obtidas pela raspagem, que era utilizada para os esfregaços.

Facilmente, então, e com frequencia, dependendo do periodo da infecção, era verificada a presença de microorganismos que não se distinguiam morphologicamente das "rickettsias", segundo as descripções dos differentes auctores que dellas se têm occupado, principalmente Rocha Lima, Wolbach, Mooser, Zinsser e collaboradores, Pinkerton e outros, e que denominamos *Rickettsia brasiliensis*.

Tambem verificámos que estes elementos podem ser evidenciados nas cellulas da membrana de Descemet, após a inoculação do "virus" na camara anterior do olho dos animaes, confirmando as verificações de Nagayo e collaboradores, em relação ao typho classico e á tsutsugamushi.

Mostraremos, separadamente, os resultados destas duas series de pesquisas.

Capitulo VIII

Presença de rickettsias nas cellulas da membrana de Descemet em animaes inoculados com o virus na camara anterior do olho

Nagayo, Tamiya, Mitamura e Sato (46), no Japão, verificaram que a inoculação do virus da tsutsugamushi na camara anterior do olho de cobaias e coelhos provoca uma reacção local caracteristica e que se podia, então, observar nas cellulas da membrana de Descemet a presença de microorganismos semelhantes ás rickettsias. Estes elementos e suas relações com a infecção foram estudados por aquelles auctores e por Hazato e Imamura (47) que os denominaram *Rickettsia orientalis*.

Tambem verificaram os auctores japoneses (Nagayo, Tamiya, Mitamura e Hazato) que o mesmo occorria com o typho exanthematico (48), no qual a

reacção ocular era seguida de reacção geral, febril, sendo tambem possivel evidenciar-se a presença da *Rickettsia prowazeki* nas cellulas da membrana de Descemet.

Repetimos os trabalhos destes auctores com o virus do typho exanthematico de São Paulo.

a) *Technica empregada.* - Como virus empregámos para as inoculações sangue citratado ou desfibrinado de cobaia infectada, colhido em periodo febril; emulsão de cerebro de *Silenus rhesus* infectado e humor aquoso de coelho, cobaia e *rhesus* infectados por via ocular.

A technica da inoculação na camara anterior do olho, assim como a reacção local e geral que determina, foi anteriormente exposta (49) e tratada com maior minucia no capitulo IV.

Para a pesquisa de rickettsias na membrana de Descemet assim procedemos: no 2.º ao 5.º dia da inoculação, quando mais intensa se mostrava a reacção ocular o animal era sacrificado e o globo ocular enucleado com os maiores cuidados de asepsia. Depois de tocar-se num ponto da cornea com um estilete aquecido, introduzia-se ahi a agulha da seringa especial com a qual se retirava pequena porção do humor aquoso para a nova passagem do virus. Com o auxilio de pinças e tesoura finas, cortava-se do globo ocular, circularmente, toda a cornea que era destacada. Com um canivete delicado, a parte posterior da cornea era raspada e o producto da raspagem espalhado em laminas convenientemente limpas.

Numa das laminas procediamos, em seguida, á coloração pelo methodo de Castaneda, para prompto conhecimento da presença dos elementos pesquisados. Dependendo deste resultado, as outras laminas eram tambem coradas pela mesma technica ou então pelo methodo de Giemsa, que descreveremos adiante, e que nos fornece coloração com melhores detalhes e mais proprias para conservação.

b) *Frequencia e morphologia das "rickettsias" nas cellulas da membrana de Descemet.* - A verificação das rickettsias nas cellulas epitheliaes da membrana de Descemet depende do periodo em que a pesquisa fôr feita. Geralmente, do 2.º ao 5.º dia, quando mais intensa fôr a reacção ocular, coincidindo com a geral, esses elementos são mais facilmente encontrados.

Em 25 animaes (cobaias, coelhos e *Mac. rhesus*) pesquisados nestas condições, verificámos cellulas parasitadas em 15, dando uma proporção de 60%. Nas pesquisas feitas, muito cedo ou tardiamente, a presença de cellulas parasitadas era muito rara e difficilmente verificada.

No conjuncto dos animaes em que esta pesquisa foi feita, em numero de 36, a proporção dos resultados positivos foi de 47%. Neste total, assignalámos

11 vezes a presença de germes de contaminação, facilmente distinguiveis morphologicamente (geralmente diplococcos Gram positivo) e pelas culturas. nos meios communs, obtidas pela semeadura do humor aquoso. Quando não existiam estas contaminações intensas. as semeaduras do humor aquoso, ou de producto da raspagem da face posterior da cornea, foram sempre negativas, mesmo nos casos em que era facilmente observada a presença de cellulas ricas em rickettsias na membrana e no humor aquoso. O mesmo aconteceu com o emprego de meios especiaes, com soro, ascite, sangue e meio de Noguchi.

Além deste caracter de não serem cultivadas nos meios artificiaes, as rickettsias se distinguiam pela sua morphologia e pela localização intracellular que geralmente apresentam. Morphologicamente se assemelham ás outras especies descriptas, apresentando tambem um certo pleomorphismo. Geralmente são elementos pequenos, de 0,5 *micron* e até menos, coccoides ou bacillares, aos pares muitas vezes, com o aspecto bipolar, não ultrapassando os dois elementos de 1 *micron* ou, ás vezes, 1,4 *micron*.

Pela coloração de Castaneda apresentam-se azuladas, distinguindo-se do resto da cellula, cujo protoplasma toma uma coloração roseo clara e roseo carregado o nucelo. Pelo methodo de Giemsa, tomam uma totalidade roseo-azulada ou violeta, dependendo da bôa technica da coloração.

A estampa V mostra uma serie de cellulas de preparados obtidos pela raspagem das cellulas da membrana de Descemet, onde melhor se poderá verificar a morphologia e disposição das rickettsias que descrevemos. Nesta estampa as figuras 1 a 5 foram obtidas de preparados corados pelo methodo de Castaneda, e as figuras 6 e 7 pelo methodo de Giemsa. As figuras 1, 2, 3, 4, 6 e 7 mostram o aspecto geralmente encontrado e a figura 5, elementos bacillares, finos, ás vezes filamentosos, verificados mais raramente.

As relações destes elementos com a infecção, pelas difficuldades technicas da sua obtenção em quantidades convenientes, não podem ser rigorosamente estabelecidas, como acontece com as rickettsias encontradas nas cellulas mesotheliaes do peritoneo, como veremos adiante. Todavia, a reacção local e geral consequente á inoculação do virus na camara anterior do olho, como já assignalámos anteriormente e o facto de não termos encontrado microorganismos semelhantes em alguns animaes não inoculados com o virus (emulsão de cerebro de cobaia normal). fazem acreditar na sua relação etiologica ou, pelo menos, que sua formação só se processe sob a influencia do "virus" especifico.

CAPITULO IX

Presença de rickettsias nas cellulas mesotheliaes da parede peritoneal de cobaias inoculadas com o virus na cavidade

Bem mais interessante é a pesquisa da rickettsia nas cellulas da parede peritoneal dos animaes inoculados na cavidade com o virus (sangue de cobaias em reacção febril ou de doentes ou emulsão de cerebro de animaes infectados e sacrificados durante a reacção).

Tendo verificado, desde o inicio, a reacção escrotal em algumas cobaias inoculadas, as pesquisas originaes foram feitas, como dissemos, nas cellulas de raspagem das folhas parietal e visceral da tunica vaginal. Ao contrario do que se verificaria com o typho endemico na America do Norte, as nossas primeiras verificações foram geralmente negativas, mesmo nos casos de reacção escrotal intensa e a colheita feita logo que ella se evidenciava.

A este respeito, o virus do nosso typho parecia differenciar-se do typho do continente septentrional, approximando-se do typho do velho mundo, onde as rickettsias podem ser vistas na tunica vaginal mais rara e difficilmente, sendo necessario que a pesquisa seja feita em certa occasião *optima*.

Apesar de Zinsser e Castaneda (50) considerarem a presença de rickettsias na tunica vaginal relacionada a certas condições, principalmente a uma menor temperatura do testiculo, começámos tambem a fazer pesquisas nas cellulas da raspagem da parede peritoneal. Estes microorganismos começaram então a ser encontrados com relativa facilidade, mesmo nas cobaias já com reacção febril.

Os primeiros resultados de nossas verificações foram resumidos em nota (51), onde estes microorganismos foram chamados de *Rickettsia brasiliensis* e sobre cuja posição systematica já expusemos o nosso modo de pensar em paginas atrás.

Mostraremos, agora, a technica que empregámos para sua pesquisa, estudo da morphologia e frequencia, nos animaes inoculados, assim como as suas relações com o typho exanthematico de São Paulo.

a) *Technica empregada.* - A cobaia a ser pesquisada é sacrificada com chloroformio e necropsiada com os cuidados usuaes em pesquisas desta natureza. Deslocada a pelle e tecido cellular sub-cutaneo, o peritoneo é posto á mostra e pinçado num ponto central, sendo aberto transversalmente com tesoura. Suspensa pela pinça a parede, para destacal-a dos orgãos abdominaes, raspa-se com bisturi a folha parietal num dos pontos, fazendo-se logo esfregaços, bem espalhados, em laminas novas e convenientemente limpas. O mesmo se faz nas

outras regiões da perede parietal. de modo a se prepararem umas 8 a 12 laminas de cada animal.

Pesquisa-se então qualquer alteração macroscopica dos organs abdominaes (augmento do baço, quasi sempre verificado) ou a presença de derrame na cavidade e colhem-se fragmentos dos organs para exame histologico. O cerebro é depois retirado com os cuidados necessarios, fragmentos são fixados tambem, pequena porção é separada e usada para nova passagem e o restante conservado em congelação. apenas num pequeno tubo esteril e convenientemente arrolhado.

Uma ou duas das laminas preparadas são immediatamente coradas segundo o methodo de Castaneda. Este methodo (52) tem a vantagem de nos fornecer resultados rapidos sobre a presença de rickettsias caracteristicas, nas cellulas mesotheliaes, ou da existencia de contaminação que, pela sua abundancia, dispensaria outras colorações.

Si a coloração pelo methodo de Castaneda indicasse a presença de numerosas cellulas parasitadas, outras laminas eram coradas por este methodo ou, então, pelo methodo de Giemsa, que fornece bellos preparados mais apropriados para conservação.

Por não ser bastante conhecido entre nós, resumimos a seguir o methodo de Castaneda para coloração de rickettsias.

Methodo de Castaneda. - Consiste em duas soluções tampões:

A.	Phosphato de sodio	23,86 grs.
	Agua destillada	1000 cc.
B.	Phosphato monopotassico	11,34 grs.
	Agua destillada	1000 cc.

Para o preparo da solução tampão, tomar:

Solução A.	88 partes
Solução B.	12 partes

Filtrar em vela Berkefeld e addicionar ao filtrado, como preservativo, 0.2% de formol. A reacção antes da addição do formol deve ser pH = 7,6.

A coloração e fixação se processa ao mesmo tempo, empregando-se:

Solução tampão	20 cc.
Formol	1 cc.
Azul de methylenio Loeffler	3 gottas

Coloração por 2 ou 3 minutos. Lavar por 30 segundos.

Segue-se a coloração de contraste:

Solução aquosa de safranina, por 1 a 2 segundos e lavar.

Esta é a technica indicada por Castaneda. Nas nossas colorações geralmente empregámos na formula acima 4 a 6 gottas do azul de methylenio de Loeffler:

Azul de methylenio U. S. P.	21 grs.
Alcool ethylico a 95%	300 cc.

após uma noite, juntar:

Agua destillada contendo potassa caustica a 1:10.000	1000 cc.

Usar somente depois de uma semana (*).

Com o methodo de coloração de Giemsa, convenientemente praticado, as preparações nos fornecem maiores detalhes e melhor se prestam á conservação:

Methodo de Giemsa. - Pode ser utilizada a technica commum de coloração por este methodo, fazendo-se a diluição do corante em agua destillada (1 ou 2 gottas por cc.). Geralmente, porém, o exsudato existente na parede e que se cora, difficulta muitas vezes a verificação das rickettsias e, quando ha excesso de deposito de materia corante exigindo lavagem mais prolongada, tambem os elementos se descoram, perdendo a coloração rosea e tomando um tom mais azulado.

Conseguimos boas preparações usando para a diluição do Giemsa a solução tampão de Castaneda. Melhores resultados, porém, obtivemos com o emprego de uma solução tampão, cuja indicação nos foi feita por O. Castro, do Instituto Biologico. Esta solução é preparada da seguinte maneira:

A. Phosphato mono-potassico (KH_2PO_4), seg. Söhrensen-Kahlbaum	9,078 grs.
Agua destillada	1000 cc.
B. Phosphato di-sodico (Na_2PO_4)	11,876 grs.
Agua destillada	1000 cc.

(*) Rivers apresenta uma modificação da technica de Castaneda, que a simplifica. E' a seguinte:

Phosphato tampão pH = 7.0	95 cc.
Azul de methylenio de Loeffler	10 cc.
Formalina	5 cc.

Corar durante 2 a 5 minutos, lavar e contracorar por 10 segundos com solução aquosa de safranina a 1%.

Para a solução tampão (onde se junta o corante: 1 gotta por cc.) tomar: 4 partes da solução A e 6 partes da solução B para 10 a 20 vezes o volume de agua destillada, cujo pH deve ser de 6,8 a 7,0.

As preparações são fixadas com alcool methylico ou ethylico e a coloração feita durante 1/2 a 2 horas, com um volume 10 vezes maior de agua destillada, ou durante uma noite, com o volume de 20 vezes, seguindo-se uma lavagem conveniente em agua corrente.

Vejamos, agora, o aspecto das rickettsias nas cellulas da parede peritoneal.

b) *Morphologia e disposição das rickettsias nas cellulas da parede peritoneal.* - As rickettsias do typho exanthematico de S. Paulo, nas cellulas da parede peritoneal, apresentam a morphologia e tamanho caracteristicos destes elementos, já descriptos, embora com diversa localização, em outras rickettsioses e correspondem ás que descrevemos nas cellulas da membrana de Descemet. Apenas no peritoneo não verificámos formas mais longas, porém somente os elementos typicos.

São geralmente coccoides ou pequenos bastonetes de 0,5 *micron*, reunidos pelas extremidades, ás vezes mostrando coloração bipolar, indicando que o par corresponde a um só elemento, quando o tamanho attinge a 1 e 1,4 *micron* de comprimento. Outras vezes correspondem somente a pequenos bastonetes finos, curtos e independentes. Não apresentam uma disposição especial nas cellulas; localizam-se, ás vezes, em grupos em certa zona do protoplasma, outras se espalham uniformemente. Geralmente são intracellulares, podendo-se ver tambem elementos fóra das cellulas, devido ao rompimento destas, ou quando o seu numero é muito elevado, como acontece em certos animaes, com infecção atypica, sem reacção febril, e nos quaes não só as cellulas da parede como o exsudato peritoneal se mostram muito ricos em rickettsias.

Pelo methodo de Castaneda, o protoplasma cellular se cora em roseo claro, o nucleo em roseo carregado e as rickettsias em azul.

Pelo methodo de Giemsa e nas preparações bem coradas, as rickettsias apresentam-se coradas em roseo ou violeta, dentro de um protoplasma azulado; nas preparações em que a coloração não ficou perfeita, os microorganismos, com sua morphologia typica, apresentam um tom azulado. A affinidade corante, com este methodo, depende da technica da coloração e do fixador usado.

Melhor do que qualquer descripção, esta morphologia e disposição das rickettsias nas cellulas mesotheliaes da parede peritoneal podem ser vistas nos desenhos apresentados na estampa VI. Os desenhos foram feitos de preparados corados pelo methodo de Castaneda nas figuras 1, 2, 3, 4 e 5 e mostram differentes cellulas desenhadas e a disposição dos microorganismos, assim como um campo desenhado, onde se vê um polycariocyto contendo rickettsias phagocytadas.

Muito raramente encontrámos rickettsias em phagocytos, o que parece estar de accordo com a verificação de Pinkerton (53) sobre o typo das cellulas pa-

rasitadas. Precisa ainda ser feito este estudo cytologico, em relação ao nosso typho. As figuras 6, 7, 8 e 9 representam desenhos feitos de preparados corados pelo methodo de Giemsa acima indicado. A figura 6 mostra uma cellula com os elementos com coloração de aspecto bipolar; num ponto da cellula nota-se u'a massa de pontinhos corados em vermelho que, talvez, representem as rickettsias numa forma de evolução granular. As figuras 7 e 8 mostram cellulas contendo elementos bacillares finos e curtos, isolados, vendo-se apenas raros com aspecto bipolar. A figura 9 mostra parte desenhada de um campo microscopico. A estampa VII reproduz microphotographias, mais ampliadas, de 2 cellulas contendo rickettsias; a fig. 1 corresponde a uma cellula desenhada (Est. VI, fig. 8) e a fig. 2 á outra cellula em preparado de outra cobaia. Todos os desenhos foram feitos usando-se o microscopio Zeiss, oc. 4, obj. imm. 1/12, dando uma ampliação de 940 diametros e empregando-se como fonte de illuminação a Leitz Speziallampe (6 volts e 5 amp.).

Desejamos deixar bem assignalado qeu todas as tentativas de cultura destas rickettsias em meios communs de laboratorio e mesmo em meios especiaes, e foram até agora numerosas, deram sempre resultado negativo. Isto quer se empregasse exsudato peritoneal, quer material de raspagem da parede contendo cellulas parasitadas. As culturas ás vezes obtidas eram sempre constituidas por germes de contaminação e que nenhuma relação morphologica ou outra poderiam ter com as rickettsias intracellulares descriptas ou com a infecção.

Vejamos agora a frequencia com que são encontradas estas rickettsias em consequencia da inoculação do virus no peritoneo.

c) *Frequencia das rickettsias nas cellulas mesotheliaes da parede peritoneal.* - Quando se tem em vista principalmente a pesquisa da rickettsia, a cobaia inoculada com o virus no peritoneo deve ser sacrificada pouco antes da reacção febril (no 3.° ou 4.° dia após a inoculação) ou nos primeiros dias da pyrexia que, manifestando-se assim, representa nova confirmação da infecção caracteristica.

Depois do 4.° dia de reacção febril, as cellulas parasitadas são mais difficilmente encontradas. Com a volta da temperatura ao normal, decorridos varios dias, isto é, na convalescença, estes microorganismos não mais são vistos.

Praticámos a pesquisa de rickettsias, não só nesses periodos favoraveis, como na maioria das cobaias inoculadas e que succumbiram em resultado da infecção ou que foram sacrificadas para fins de passagem do virus.

Diversas cobaias normaes ou inoculadas no peritoneo com sangue ou emulsão de cerebro de animaes normaes foram tambem examinadas, sendo negativos os resultados.

Em duas cobaias inoculadas com o virus por via sub-cutanea e sacrificadas durante a reacção febril, a pesquisa no peritoneo foi negativa. Embora esta verificação precise de ser repetida com maior numero de animaes, talvez somente

a inoculação do virus na cavidade da serosa é que provoca o apparecimento das rickettsias especificas em cellulas de revestimento. Assim sendo, muito provavelmente a inoculação do virus na cavidade pleural ou pericardica, por exemplo, provocará o apparecimento das rickettsias em certas das suas cellulas de revestimento. Esta hypothese merece verificação e tambem será interessante saber-se si este facto é proprio ao virus do typho exanthematico de São Paulo ou si é commum a todas as rickettsioses.

Registamos, a seguir, a pesquisa de rickettsias em mais de 200 cobaias inoculadas no peritoneo com o virus.

Os resultados que vamos mostrar e que são resumidos no quadro IX representam os verificados em exames relativamente rapidos, não ultrapassando 10 a 15 minutos para cada pesquisa. De modo que as proporções seriam maiores si, nos casos em que este exame foi considerado negativo, ainda se prolongasse a pesquisa, correndo-se toda a lamina ou varias dellas com material do mesmo animal.

Nos resultados positivos estão incluidos todos os casos em que se encontraram cellulas parasitadas, desde os em que as rickettsias eram raras (+) e difficilmente encontradas até os, menos numerosos, em que ellas eram muito abundantes (++++) e facilmente visiveis em quasi todos os campos microscopicos.

Eis os resultados:

QUADRO IX

Grupo	Periodo da pesquisa	Cobaias examinadas	Resultado positivo	Resultado negativo	Porcentagem dos resultados positivos
I	Antes da reacção febril ou que não a apresentaram após varios dias (formas atypicas)	21	15	6	71.4 %
II	Sacrificadas no 1.° dia de reacção febril	5	5	0	100 %
III	Sacrificadas no 2.° dia de reacção febril	32	30	2	93.7 %
IV	Sacrificadas no 3.° dia de reacção febril	42	38	4	90.4 %
V	Sacrificadas no 4.° dia de reacção febril	40	28	12	70 %
VI	Sacrificadas depois do 4.° dia de reacção febril ou que succumbiram depois deste periodo.	72	40	32	55.5 %
VII	Cobaias sacrificadas em convalescença, isto é, muitos dias depois da volta da temperatura ao normal.	8	0	8	0 %
	Total das cobaias examinadas, não incluindo as do grupo VII	212	156	56	73.5 %

Verifica-se, pelo quadro acima, que no total das cobaias inoculadas no peritoneo com o virus do typho de São Paulo, pudemos descobrir a presença de rickettsias nas cellulas mesotheliaes da parede peritoneal em 73,5% dos animaes. Esta porcentagem augmenta quando a pesquisa é feita em periodo favoravel, isto é, mais precocemente. A proporção foi de 71,4% de resultados positivos em animaes sacrificados antes de se ter manifestado a reacção febril. Neste grupo foram incluidos, não só os casos de infecção atypica, sem reacção thermica, quando as rickettsias são abundantes, mesmo no exsudato peritoneal, que augmenta nestes casos, mas tambem as sacrificadas depois de decorridos alguns dias, e cuja temperatura não se tinha elevado typicamente, além de um animal, de resultado negativo, sacrificado, talvez cedo demais, no 2.° dia da inoculação.

A proporção de resultados positivos foi de 100% nas cobaias sacrificadas no 1.° dia de reacção febril, sendo variavel, mas geralmente de 3 a 5 dias, o numero de dias decorridos da inoculação, de accordo com a incubação.

Nos sacrificados no 2.° dia de reacção febril, a proporção foi de 93,7%; no 3.° dia de reacção febril, de 90,4%. A proporção foi de 70% no grupo de cobaias sacrificadas durante o 4.° dia e de 55,5% nas sacrificadas no 5.° dia ou nos dias subsequentes, mas ainda pyreticas ou então que succumbiram á infecção depois do periodo de reacção.

Estes resultados correspondem ao 1.° virus (L) que estudámos e que se achava então na sua 68.ª geração. Com a segunda amostra de virus (W), na 18.ª geração, num total de 30 cobaias examinadas, foram encontradas as rickettsias em 60% dos animaes, cuja maioria se incluiu nos grupos V e VI do quadro (*). Tambem nas cellulas da parede peritoneal de *Macacus rhesus*, inoculados com o virus no peritoneo, pudemos evidenciar a presença de rickettsias.

Si outros elementos não existissem, bastaria a frequencia acima assignalada das rickettsias nos animaes inoculados para mostrar sua especificidade e relação com a infecção.

Com a continuação das nossas experiencias com o exame de maior numero de animaes (superior a 600) e nos quaes a pesquisa foi feita geralmente em periodo mais avançado, na maioria das vezes depois do 4.° dia de reacção febril ou quando succumbiam, somos forçados a acreditar que não existe verdadeiramente um periodo optimo para que as rickettsias sejam encontradas, embora o exame feito mais precocemente facilite a pesquisa, como foi assignalado. A sua presença deve, muito provavelmente, estar relacionada, não somente ao "virus" inoculado, como a algum factor de natureza individual, variavel, ás vezes, com os diversos animaes inoculados. Geralmente depois de uma grande serie de passagens somente com emulsão cerebral, as rickettsias são difficilmente encontradas,

(*) Estes virus, em junho de 1932, se encontravam, respectivamente, na 91.ª e 45.ª gerações.

reapparecendo, com abundancia em certos animaes, após algumas passagens com sangue virulento, e mantendo-se sua presença em novas passagens, mesmo com cerebro.

Esse factor individual, de natureza ainda não determinada, deve ser levado em consideração, parecendo sua existencia justificar-se pelos resultados de experiencias relativas á influencia que certas substancias, como o benzol, ou uma dieta de carencia ou acção de raios X a que se submettem previamente os animaes, exercem sobre o apparecimento das rickettsias especificas.

Com material de raspagem da tunica vaginal, em numerosas e novas pesquisas feitas, mesmo em casos com reacção escrotal, menos frequentemente pudemos verificar a presença de cellulas contendo rickettsias.

Relativamente á pesquisa nas cellulas da parede peritoneal, os nossos resultados têm sido confirmados por L. Salles Gomes, do Instituto Bacteriologico, J. R. Meyer, O. Bier, O. Castro, do Instituto Biologico, e outros collegas em Butantan (*).

Estudadas, assim, a morphologia e a frequencia da *Rickettsias brasiliensis*, indicaremos a seguir alguns ensaios já feitos para melhor verificação das suas relações com o typho exanthematico de São Paulo.

Capitulo X

Relação das rickettsias do typho exanthematico de São Paulo com a infecção experimental

Alem da relação entre a rickettsia descripta e a infecção experimental, traduzida pela elevada proporção em que estes microorganismos são encontrados, seria do maior interesse a sua determinação pelos meios immunologicos e outros de que se dispõe. Para isto, recorremos á verificação do poder infectante e das relações antigenicas que pudessem elles ter em relação á infecção experimental.

(*) Mais recentemente, L. Salles Gomes conseguiu pôr em evidencia a presença de rickettsias em cortes de organs (testiculos), localizando-se os elementos nas paredes vasculares (Comm. á Soc. de Biologia de São Paulo, 8-III-932). Esta localização é de importancia para o estudo das relações histologicas do nosso typho com infecções affins, principalmente com a febre maculosa das Montanhas Rochosas. Em pesquisas feitas com material de varias cobaias infectadas, pudemos tambem evidenciar esta localização das rickettsias, que se dispõem, em massas ás vezes consideraveis, na tunica media e no endothelio dos vasos.

Para o primeiro fim visado, seria indispensavel a obtenção das rickettsias livres do "virus", phase provavelmente tambem existente na peritoneo; para a segunda averiguação do problema, recorrémos ao preparo de uma vaccina com material rico em rickettsias, segundo a technica já ensaiada por Zinsser e Castaneda (53), cujo poder immunizante em relação ao virus seria verificado, ou então pelo registo da acção neutralizante *in vitro* do soro de um animal immunizado com as rickettsias em relação ao virus.

Vejamos, a esse respeito, as experiencias que até agora realizámos e os seus resultados.

a) *Infectuosidade da rickettsia.* - Para esta verificação, sacrificam-se cobaias inoculadas por via peritoneal com o virus, isto é, com sangue ou emulsão de cerebro de animal infectado e sacrificado em occasião favoravel. O peritoneo é lavado com certa quantidade de agua physiologica, sendo a folha parietal convenientemente raspada para desprendimento de maior numero possivel de cellulas parasitadas. Verificada previamente a presença de rickettsias nas cellulas, a emulsão assim obtida é fortemente agitada num frasco contendo bolas de vidro, para o maior rompimento possivel das cellulas e libertação dos microorganismos.

A confirmação da infecção no animal sacrificado é feita pela inoculação de emulsão do seu cerebro.

Depois de bem agitada, a emulsão peritoneal contendo rickettsias é inoculada para verificação da sua pathogenicidade, que, neste caso, poderia ser tambem attribuida á presença do "virus". Para eliminação desta ultima hypothese, a emulsão é centrifugada em alta velocidade e lavada com agua physiologica, sendo a centrifugação e lavagem do deposito repetidas cerca de 6 a 10 vezes, de modo a se eliminar o "virus" que já não existiria ou somente em diluição minima, incapaz de provocar a infecção experimental.

Como controle da experiencia, repetimos a mesma verificação com outra cobaia, inoculada por via subcutanea e em cujo peritoneo não foi verificada a presença de rickettsia.

Resumimos os resultados obtidos:

Experiencia I - *Cobaia* 242: Inoculada em 10-VI-931, no peritoneo, com virus (emulsão de cerebro do *Cebus* I). Depois de 2 dias de incubação, iniciou-se a reacção febril, acima de 40°. Foi sacrificada em 18-VI-931, no 6.° dia de reacção. A presença de rickettsia foi verificada nos esfregaços da parede, porém o numero de cellulas parasitadas era reduzido. Mesmo assim foi aproveitado o liquido de lavagem e raspagem peritoneas obtido pela technica acima descripta. A infecção do animal confirmou-se pela inoculação de emulsão de seu cerebro na cobaia 254. A emulsão peritoneal obtida foi inoculada na cobaia 252. A mesma emulsão depois de 2 lavagens apenas do deposito da cen-

trifugação, foi inoculada na cobaia 256, e, depois de 10 lavagens e centrifugações successivas, foi inoculada na cobaia 257.

Cobaia 254: Inoculada com emulsão de cerebro da cobaia 242 em 18-VI-931. Incubação de 3 dias, reacção febril durante 4 dias, sacrificada em 25-VI-931, após ter sido picada por *Ornithodoros*. Com emulsão de seu cerebro foi inoculada a cobaia 271 e com o sangue a cobaia 277. Estas ultimas tiveram infecção caracteristica.

Cobaia 252: Inoculada em 18-VI-931 com 1 cc. de liquido de lavagem peritoneal da cobaia 242. Incubação de 3 dias; temperaturas: 38°,8, dia da inoculação, 38°,5; 38°,6; 38°,5; 3 dias de reacção febril (40°,5; 39°,8; 40°), e morreu na manhã de 24-VI-931. Rickettsias no peritoneo (++++).

Cobaia 256: Inoculada em 18-VI-931 com 2 cc. de emulsão de producto de raspagem e lavagem peritoneal após duas centrifugações. Incubação de 5 dias, reacção febril durante 5 dias, volta da temperatura ao normal. Resistiu á infecção.

Cobaia 257: Inoculada em 18-VI-931 com 2 cc. de emulsão do producto de raspagem peritoneal após 10 lavagens e centrifugações successivas. Incubação de 4 dias e 2 de reacção não muito alta (temperatura: 38°,6, no dia de inoculação; 38°,5; 38°,6; 39°; 38°,3; 39°,7; 39°,8). Morreu ás 11 horas da manhã de 25-VI-931. Rickettsias no peritoneo (+).

Verificou-se assim que o liquido peritoneal era infectuoso mesmo depois de 10 lavagens e centrifugações successivas. Cada lavagem era feita em tubo centrifugador com capacidade para 20 cc. O resultado positivo após 2 lavagens pode ser ainda attribuido á presença do "virus" no liquido; o mesmo não acontece após a 10.ª lavagem, pois o "virus" estaria diluido demais e, assim, a infecção só correria por conta das rickettsias existentes, embora não abundantes primitivamente, e que por serem mais densas, se depositam com os detritos cellulares após cada centrifugação.

Para controle desta experiencia, no mesmo dia, fez-se identica verificação com material da cobaia 243, inoculada por via subcutanea, com o mesmo material infectante.

Experiencia II - *Cobaia* 243: Inoculada em 10-VI-931, por via subcutanea com emulsão de cerebro do *Cebus* I. Incubação de 4 dias e 4 de reacção febril. No ultimo dia, em 18-VI-931, foi sacrificada e aproveitado o material do peritoneo pela forma indicada. Nos esfregaços da raspagem peritoneal a pesquisa de rickettsias foi negativa. Inoculou-se emulsão de cerebro, para confirmação da infecção, na cobaia 255; o liquido obtido da lavagem peritoneal, na dose de 2 cc., foi inoculado na cobaia 253; o mesmo material, após ter soffrido 10 centrifugações e lavagens successivas, foi inoculado na cobaia 258.

Os resultados destas inoculações, feitas todas por via peritoneal, foram os seguintes:

Cobaia 255: Inoculada em 18-VI-931 com emulsão de cerebro de cobaia 243. Incubação de 5 dias, reacção febril durante 3 dias, quando foi sacrificada. Rickettsias no peritoneo (—).

Cobaia 253: Inoculada em 18-VI-931 com material (2 cc.) de lavagem e raspagem peritoneal após 2 centrifugações. Incubação de 4 dias, reacção febril durante 4 dias e morte durante a noite de 27 para 28-VI-931, não tendo sido feita a pesquisa de rickettsias no peritoneo.

Cobaia 258: Inoculada em 18-VI-931 com 2 cc. de emulsão de material de lavagem e raspagem peritoneal após 10 centrifugações successivas. Não apresentou reacção febril caracteristica. Decorridos 22 dias, em 10-VII-931, foi reinoculada com o virus activo (emulsão de cerebro da cobaia 278): após 3 dias de incubação, iniciou-se reacção febril que perdurou 6 dias, morrendo o animal 4 dias depois, na manhã de 23-VII-931. A pesquisa da rickettsias no peritoneo foi negativa, talvez pelo facto de ter sido tardia.

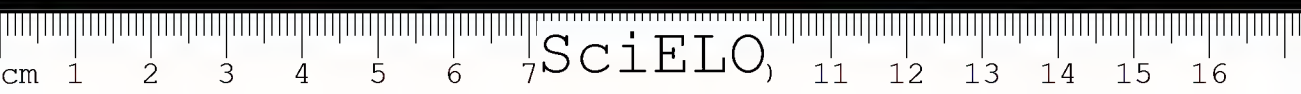
Como se vê pelos resultados acima, a ausencia de rickettsia no material da raspagem e lavagem peritoneal evita a infecção depois de 10 centrifugações successivas (cobaia 258); o resultado positivo após 2 centrifugações somente (cobaia 253) pode ser attribuido ao virus, ainda não sufficientemente diluido e, portanto, capaz de provocar a infecção.

Outra experiencia foi emprehendida, sendo a colheita do material do peritoneo feita em periodo mais favoravel, e as rickettsias foram mais abundantemente encontradas.

Experiencia III - *Cobaia 260*: Inoculada em 18-VI-931 com emulsão de cerebro da cobaia 243; no 4.° dia da inoculação e 1.° de reacção febril, foi injectada com 20 cc. de agua physiologica no peritoneo e, em seguida, sacrificada, sendo o liquido do peritoneo recolhido, depois de raspada a parede. Para confirmação da infecção foi inoculada com o cerebro a cobaia 263. O liquido de lavagem peritoneal contendo rickettsias foi inoculado na cobaia 262. Depois de 6 centrifugações successivas e outras tantas lavagens com agua physiologica, a emulsão do material peritoneal foi inoculada na cobaia 264.

Os resultados destas inoculações, todas por via peritoneal, foram os seguintes:

Cobaia 263: Inoculada em 22-VI-931 com emulsão de cerebro da cobaia 260, colhido no 1.° dia de reacção febril: incubação de 3 dias, reacção febril durante 5 dias. Amanheceu morta em 2-VII-931.

Cobaia 262: Inoculada em 22-VI-931 com 2 cc. do liquido de lavagem e raspagem peritoneal da cobaia 260: incubação de 3 dias, reacção febril durante 7 dias; foi sacrificada em 2-VII-931, sendo inoculada uma emulsão de seu cerebro

na cobaia 283, que teve infecção typica com 4 dias de incubação, 2 de reacção febril e morte na manhã de 9-VII-931; a passagem do virus foi continuada através de outras cobaias.

Cobaia 264: Inoculada em 23-VI-931 com 2 cc. de emulsão de raspagem e lavagem peritoneal após 6 centrifugações successivas. Depois de nova centrifugação a emulsão foi feita em agua physiologica formolada a 0,2%, sendo empolada e conservada na geladeira para posteriores experiencias de vaccinação. Depois de uma incubação de 7 dias (num dos quaes a temperatura se elevou a 40°,9, para voltar á media normal nos dois dias seguintes), iniciou-se a reacção febril acima de 40°, perdurando 7 dias. Houve mais 5 dias de temperatura proxima á normal e a cobaia morreu na manha de 13-VII-931.

A infecção desta cobaia deve ser attribuida tambem ás rickettsias presentes no material inoculado, embora o numero de lavagens não tenha sido tão elevado como na experiencia I.

Outras experiencias. - Outras experiencias feitas mostraram de modo evidente a infectuosidade do material obtido de raspagem peritoneal, infectuosidade geralmente maior do que a da emulsão cerebral, quando era muito rico em rickettsias. Citemos, apenas, as seguintes:

Cobaia 170: Inoculada em 14-IV-931, no peritoneo, com 1 cc. de derrame peritoneal da cobaia 161. Esta ultima teve infecção typica, sem reacção febril até o 6.° dia da inoculação, quando succumbiu; verificou-se abundante derrame no peritoneo, de aspecto soro-hemorrhagico e baço augmentado de modo caracteristico. Tanto nos esfregaços de raspagem da parede, como no derrame, encontraram-se rickettsias em abundancia (++++). A cobaia 170, inoculada, apresentou, após 2 dias de incubação, reacção caracteristica durante 5 dias, quando foi sacrificada, em 21-IV-931, para novas passagens.

Cobaia 230: Foi inoculada no peritoneo, em 21-5-931, com emulsão de cerebro da cobaia 224. No 4.° dia da inoculação, com a temperatura de 39.°,5, foi sacrificada. Os esfregaços de raspagem peritoneal mostraram rickettsias em grande abundancia (++++). O peritoneo foi lavado e raspado, e o material emulsionado em 20 cc. de agua physiologica. Com 1 cc. desta emulsão foi inoculada a cobaia 232.

Cobaia 232: Inoculada em 26-V-931 com 1 cc. de liquido de lavagem peritoneal da cobaia 230. A reacção desta cobaia foi a seguinte, nos dias que se seguiram: 38°,5; 39°,7; 40°; 40°,2; 40°,1. Morreu na noite de 31 para 1-VI-931.

Cobaia 329: Foi inoculada em 21-VIII-931 com liquido de lavagem e raspagem peritoneal (emulsão em 20 cc. de agua physiologica), na dose de 1 cc. de uma diluição a 1% (na realidade maior) da emulsão original. Teve incubação de 5 dias e reacção febril de 6 dias, resistindo á infecção, mostrando-se, porém.

immunizada em relação a uma segunda inoculação do virus activo feita em 16-IX-931.

Por todos estes resultados fica evidente a infectuosidade do material de raspagem peritoneal e que as rickettsias, desembaraçadas o mais possivel do "virus", são capazes de determinar na cobaia a infecção experimental caracteristica, da mesma forma que quando se emprega o sangue ou emulsão de cerebro de uma cobaia infectada.

Outra comprovação da relação etiologica da rickettsia que descrevemos com o typho exanthematico de São Paulo seria a verificação do seu valor antigenico para com a infecção experimental.

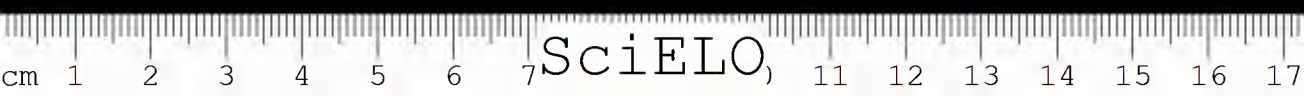
Vejamos a seguir as experiencias que fizemos neste sentido e seus resultados.

b) *Poder antigenico ou vaccinante das rickettsias em relação á infecção experimental.* - Todas as tentativas, aliás numerosas, que fizemos para a immunização de cobaias com vaccinas preparadas com o cerebro de animaes infectados, foram negativas. Desnecessaria se torna agora a descripção completa destas experiencias. Diremos apenas que preparámos a vaccina de accordo com as technicas empregadas para o preparo da vaccina amarillica (com formol, chloroformio, etc.), com algumas modificações aconselhadas na occasião. Os animaes vaccinados com 1, 2 e 3 doses, espaçadas de uma semana, não resistiam á inoculação de prova, com o virus activo, feita geralmente um mês depois da ultima inoculação.

A forma do "virus" representada pela rickettsia possue, porém, propriedades antigenicas segundo já havia sido verificado por H. da Rocha Lima, com a *Rickettsia prowazeki* existente nos piolhos infectados, suggerindo o preparo de uma vaccina com emulsão destes transmissores, por Spencer e Parker (55) e Connor (56), em relação á febre maculosa das Montanhas Rochosas, com o emprego de carrapatos infectados, e, mais recentemente, por Zinsser e Castaneda (57), que conseguiram o preparo de uma vaccina formolada dotada de propriedades vaccinantes, com material de tunica vaginal e peritoneo, rico em "corpusculos de Mooser", tornando estes elementos mais abundantes por meio de injecções de benzol (58) ou por uma dieta especial de carencia (59) ou, ultimamente, submettendo os animaes, previamente, á acção de raios X (60).

Para a verificação do valor antigenico ou vaccinante da rickettsia do nosso typho, preparámos algumas partidas de vaccina com material de raspagem peritoneal rico nestes microorganismos.

Eis uma das experiencias, a mais completa da serie, e a technica empregada no preparo:

Technica do preparo da vaccina. A cobaia 190 foi sacrificada em 8-V-931, no 5.° dia após ter sido inoculada, no peritoneo, com o virus (emulsão cerebral da cobaia 185), estando no 1.° dia da reacção febril. A cavidade peritoneal

foi lavada com 20 cc. de agua physiologica formolada a 0,2%, sendo a folha parietal raspada para que maior numero de cellulas se destacassem. O liquido obtido foi agitado e lavado com a mesma solução, sendo o deposito da centrifugação, rico em rickettsias, emulsionado em 20 cc. da solução formolada e distribuido em ampolas de 2 cc., que foram conservadas no frigo.

Experiencia de vaccinação. - No dia 13-V-931, isto é, 5 dias após o preparo da vaccina, foi iniciada a vaccinação de 2 cobaias, uma com 2 doses e outra com 3 doses, sendo o virus activo inoculado, para verificação da immunidade, cerca de 20 dias depois da ultima injecção. Eis os resultados da experiencia:

Cobaia 217: Soffreu 3 injecções da vaccina: a 1.ª de 4 cc., por via subcutanea, em 13-V-931; a 2.ª de 4 cc., por via peritoneal, em 18-V-931 e a 3.ª de 2,5 cc., por via subcutanea, em 23-V-931. Após a 1.ª inoculação observou-se reacção local, com edema, motivo por que a 2.ª dose foi feita no peritoneo. Como consequencia das injecções a cobaia não apresentou reacção febril. Em 17-VI-931, decorridos 25 dias da ultima dose, foi inoculada com o virus seguramente activo (emulsão de cerebro da cobaia 244), não apresentando reacção febril e mostrando-se, pois, immunizada.

Cobaia 218: Soffreu apenas 2 injecções da vaccina: a 1.ª de 4 cc., por via subcutanea, em 13-V-931 e a 2.ª, por via peritoneal e na mesma dose, em 18-V-931. A 1.ª inoculação provocou, talvez devido ao formol, reacção local e ligeira necrose da pelle. A cobaia, porém, não apresentou reacção febril. Decorridos 25 dias, em 10-VI-931, foi inoculada com o virus activo (emulsão de cerebro da cobaia 239). Como consequencia, a temperatura não passou da media normal durante longa observação, mostrando-se, pois, a cobaia immunizada. O virus era seguramente activo, pois serviram como testemunhas da inoculação deste dia a cobaia 244 e o *Alauatta* I (bugio), que tiveram infecção caracteristica, inclusive com provas de passagens.

Estas duas experiencias, alem dos outros elementos que já estudámos, mostram tambem as relações das rickettsias que descrevemos com o typho de S. Paulo, em virtude do poder antigenico em relação á infecção experimental manifestado por uma vaccina contendo estes microorganismos.

Finalmente, para completarmos este cyclo de demonstrações, uma vez que as rickettsias provocam uma immunidade activa, tornando, portanto, possivel a prophylaxia da infecção por meio de uma vaccina, faltava-nos verificar si o soro de um animal com ellas inoculado teria alguma acção sobre o proprio "virus".

Iniciámos nesse sentido uma serie de experiencias, cujos primeiros resultados, embora sejam os mais animadores, não nos auctorizam ainda a uma conclusão definitiva.

Em todo caso, merecem registo desde já, pois talvez encerrem a solução da therapeutica especifica das "rickettsioses" em geral.

c) *Poder virucida do soro anti-rickettsico.* - E' facto conhecido, depois dos trabalhos de Nicolle e Conseil (61), que o soro de convalescentes do typho classico possue propriedades preventivas em relação á infecção. Estas propriedades só são, de um modo certo, presentes no soro do convalescente como consequencia da infecção, apresentando variações conforme a intensidade desta. E' o que acontece tambem com os animaes sensiveis, embora os anticorpos preventivos ou neutralizantes do virus desappareçam depois de certo tempo. Com relação ao "virus" do typho endemico da America do Norte, Zinsser e Batchelder (62) verificaram sua neutralização "in vitro" com soro de cobaia, desde que a sangria fosse feita do 1.° ao 10.° dia da defervescencia sómente. Julgam que se trata antes de uma immunização activa pelo virus, talvez attenuado, mas ainda existente, do que de uma immunização passiva pelo soro.

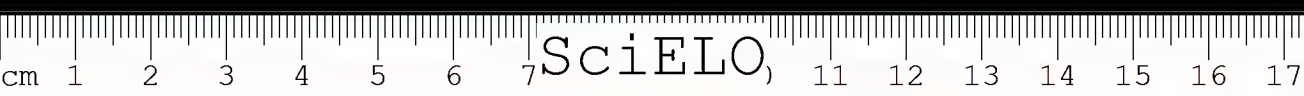
O soro de convalescente não apresenta propriedade curativa e não se conseguiu, até hoje, o preparo de um soro activo com a inoculação do virus em animaes (*).

Tendo verificado que o asno pode apresentar uma infecção inapparente, após a inoculação do virus, e mesmo reacção febril pela inoculação por via venosa, Nicolle e Conseil (63) obtiveram com este animal um soro dotado de algum poder preventivo.

Geralmente todas as numerosas tentativas para a obtenção de um soro contra o "typhus" são baseados na inoculação em animaes (carneiro, cavallos, etc.) do virus representado pelo sangue ou emulsão de organs (cerebro principalmente) de doentes ou animaes sensiveis infectados experimentalmente. Estas tentativas têm talvez falhado pelo facto de, não sendo os grandes animaes susceptiveis ao virus, este se destruir ou se inactivar logo após a inoculação, não podendo, pois, determinar a formação de anticorpos. Esta occorrencia se justifica pelo facto de uma vaccina preparada com emulsão de cerebro de cobaia, como assignalámos, não proteger estes animaes contra a infecção experimental, talvez pela circumstancia de, segundo hypotheses suggeridas por A. do Amaral, occorrer, no caso da inoculação de cerebro virulento de animal infectado, qualquer dos dois phenomenos seguintes:

1. ou uma phase anantigenica da evolução das rickettsias;

2. ou a intervenção da conhecida acção phylactica dos lipoides, que impossibilitaria o proprio exercicio do poder antigenico do virus inoculado. Em quai-

(*) Mais recentemente, alguns auctores, entre elles Plazy e Iermain, referem resultados favoraveis com o emprego do sangue total de convalescente no tratamento da "febre exanthematica".

quer das hypotheses, occorreria a impossibilidade da formação dos anticorpos correspondentes ao virus.

O mesmo não se poderá dizer quando se lança mão, como vimos, das ricket tsias que são seguramente dotadas de propriedades immunizantes em relação á infecção experimental. O soro de um animal immunizado com estes elementos deveria possuir tambem alguma influencia sobre o "virus" e, portanto, sobre a infecção, embora não se possa ainda nutrir grandes esperanças quanto a seu valor curativo, de que é desprovido o proprio soro de convalescente.

Baseado nas considerações expostas, resolvémos immunizar 2 carneiros; sendo um com o virus somente e outro com material rico em rickettsias e verificar si os soros destes animaes possuiam alguma acção neutralizante *in vitro* sobre o virus.

Estes animaes soffreram um numero restricto de inoculações, de modo que os resultados que vamos resumir são somente preliminares, não auctorizando, como já dissemos, a conclusão definitiva.

Technica empregada. - O virus que serviu para a inoculação do carneiro I era representado por emulsão de cerebro de cobaias infectadas e sacrificadas em periodo de reacção febril, geralmente no 4.° dia, emulsionado em agua physiologica e passado em gaze, sendo a inoculação praticada por via subcutanea. A 1.ª dose foi representada por cerebro de uma cobaia e as seguintes por 2 cerebros, sendo as inoculações espaçadas de varios dias.

As rickettsias que serviam para a inoculação do carneiro II eram representadas por lavagem peritoneal e emulsão de toda a folha parietal, triturada em areia, onde os microorganismos eram encontrados com facilidade. A emulsão assim obtida era centrifugada por poucos minutos e a pequena velocidade, para depositar os tecidos. O liquido era inoculado por via subcutanea, em doses crescentes, com o emprego de maior numero de peritoneos e intervallados de varios dias.

Os carneiros não apresentaram reacção febril accentuada alem da media normal; apenas perderam peso, o que se poderá attribuir ao facto de terem ficado presos, pois que viviam soltos no pasto.

Depois de 13 dias da 3.ª inoculação, foram sangrados em cerca de 500 cc. de sangue cada um. Para maior rendimento do soro, o sangue foi recebido em balão contendo bolas de vidro e desfibrinado, sendo, em seguida, centrifugado e o soro separado. Uma parte, usada nas experiencias que vamos descrever, foi separada e o restante, depois de phenolado a 0,4%, foi filtrado em papel fino e distribuido em ampolas de 5 cc.

Para a verificação do poder neutralizante dos dois soros, doses diversas (2,5 e 10 cc.) eram addicionadas ao virus (emulsão de cerebro infectante diluido na dose de 1 gr. do orgam para 10 cc. de agua physiologica, sendo a emulsão

passada em gaze) ; depois de um contacto de meia hora na temperatura ambiente, a mistura era inoculada no peritoneo de cobaias e coelhos normaes.

Como testemunhas foram usados soros normaes de carneiro e de cavallo.

Resultados preliminares. - Das varias experiencias até agora realizadas com os soros da primeira sangria destes carneiros, feita depois de 13 dias da 3.ª inoculação dos antigenos indicados acima, e as testemunhas com soro destes animaes tomado antes da immunização e com soro normal de cavallo, pudemos verificar que, na menor dose usada (2 cc.), somente o soro do carneiro II possuia certo poder virucida "in vitro".

E' preciso lembrar, em todo caso, que soros normaes de certos animaes podem apresentar poder neutralizante em relação ao virus verdadeiro. Isto verificámos, ha tempo, com o virus vaccinico, sobre o qual o soro de vitello normal puro e mesmo diluido a 1/10 apresenta acção "in vitro", sendo que o indice de immunidade (nos vitellos já vaccinados) é indicado pelo poder virucida em titulo a 1/50 ou 1/100 em relação ao virus de determinada actividade (Gins positivo a 1/1000).

Por outro lado, é preciso ver que a quantidade do virus (emulsão de cerebro) infectante misturada ao soro era excessivamente elevada, representando, talvez, muito mais de 1000 D. M. I. (doses minimas infectantes). Mesmo nestas condições, por esses resultados preliminares, parece ter havido a formação de anticorpos virucidas em certa proporção somente no soro do carneiro II immunizado, como vimos, com material contendo rickettsias.

Somente a continuação dos ensaios, sob outras condições experimentaes (*), poderá fornecer conclusões mais seguras relativamente á possibilidade de se obter tambem uma immunidade passiva, portanto um soro anti-rickettsico, dotado de propriedades virucidas e, talvez, preventivas em relação ao virus.

Independente, porém, da confirmação desta ultima hypothese, julgamos ter demonstrado, pelos resultados obtidos nas diversas phases descriptas das nossas experiencias, a estreita relação etiologica existente entre a rickettsia que descrevemos, *Rickettsia brasiliensis*, e o typho exanthematico de São Paulo.

d) *Verificação da Rickettsia brasiliensis em carrapato (Amblyomma cajennense) infectado.* - Em trabalhos anteriores (64 e 65) foram relata-

---

(*) Com este objectivo, temos em andamento outras pesquisas. Entre estas, assignalamos as referentes á cultura da *Rickettsia brasiliensis* em tecidos, segundo as technicas de Rivers, Haagen e Muchenfuss e outros, com o fim de obter material abundante e rico para as inoculações.

Pretendemos igualmente, empregar, para a obtenção de material rico para as inoculações de grandes animaes (carneiro e cavallo), os methodos de enriquecimento *in vivo*, já citados, e da rickettsia desenvolvida em carrapatos (*Amblyomma cajennense*) infectados e nos quaes são encontradas em grande quantidade.

das as pesquisas realizadas no nosso Instituto sobre a possibilidade da transmissão experimental do virus por *Ixodidae* e as realizadas com alguns arthropodos (pediculideos, pulicideos, acarianos, etc.) sob condições naturaes. Os resultados destes estudos, tendentes a elucidar aspectos epidemiologicos da infecção, os referentes á pesquisa de depositarios do virus na natureza (66) e o estudo de um virus isolado de ratos da zona urbana da cidade, acham-se expostos em outros trabalhos especiaes e pormenorizados.

Continuando as nossas pesquisas sobre os possiveis transmissores do typho exanthematico de S. Paulo, realizámos uma nova serie de pesquisas com carrapatos, com a efficiente collaboração de Flavio da Fonseca, distincto companheiro de trabalho. Os nossos resultados, bastante interessantes e que se apoiam na experimentação, são expostos com minucia em trabalho á parte (67).

Ainda com o fim de accentuar aqui, com novos dados além dos já expostos, a relação etiologica da rickettsia que descrevemos com o typho de S. Paulo, diremos algumas palavras sobre essas pesquisas.

A infecção experimental pode ser transmittida por intermedio de carrapatos e, dentre as especies encontradas na zona infectada, pelo *Boophilus microplus* e pelo *Amblyomma cajennense*.

Com o *Amblyomma cajennense* obtivemos a infecção não somente pela inoculação de carrapatos infectados, como tambem pela picada.

Verificámos, em esfregaços de ovos de *Amblyomma* infectado, a presença de microorganismos semelhantes á rickettsia e tambem a infecção pela inoculação de ovos em cobaia, observando a presença de rickettsias nas cellulas da parede abdominal deste animal. Confirmamos, assim, os resultados de nossas anteriores pesquisas, quanto á transmissão hereditaria do "virus" neste carrapato.

Finalmente, em cortes de *Amblyomma* infectado pudemos pôr em evidencia a presença de microorganismos, em numero consideravel, semelhantes ás rickettsias e cuja morphologia e localização no organismo do carrapato estão sendo estudadas e serão descriptas em trabalho a ser publicado em collaboração com aquelle distincto collega (*).

(*) Em nota á margem, num trabalho anterior, apresentado, em 8-VII-1932, á Soc. Biol. de São Paulo ("Novas experiencias sobre a transmissão experimental do virus do typho exanthematico de São Paulo por carrapatos"), assignalamos já este facto. Examinando maior numero de exemplares infectados experimentalmente, desde 7 dias após o fim da alimentação infectante até prazo superior a 30 dias, quando os carrapatos eram fixados, pudemos melhor estabelecer a localização da *Rickettsia brasiliensis* nesse Ixodideo.

No inicio se apresentam, com sua morphologia typica, corados em violeta pelo Giemsa, enchendo numerosas cellulas no interior do intestino (diverticulos), cellulas longas e que se dispõem em columnas partindo da parede e que contêm os productos alimentares em vias de digestão; nas paredes os micro-organismos são encontrados tambem no cytoplasma cellular. As rickettsias são encontradas em outros organs, de sorte que um estudo mais minucioso está sendo feito e constituirá, como dissemos, objecto de um trabalho á parte

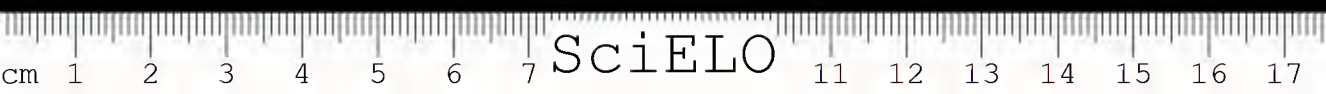
Assignalando a presença da *Rickettsia brasiliensis no carrapato* (*Amblyomma cajennense*), seu mais provavel transmissor intermediario, que havia sugado um animal infectado experimentalmente, completamos os estudos que emprehendemos sobre suas relações com o typho exanthematico de S. Paulo e damos como concluida a 2.ª parte desta monographia.

Resumo e conclusões da 2.ª parte

A 2.ª parte deste trabalho representa um estudo de conjuncto sobre a rickettsia que descrevemos no typho exanthematico de São Paulo, sua frequencia e relação com a infecção experimental.

Numa introducção, fizemos considerações geraes sobre o grupo de infecções que constituem as "febres typho-exanthematicas" ou "typhus", mostrando a conveniencia de ser elle desligado do grupo dos verdadeiros virus filtraveis para constituir um grupo á parte, ao qual caberia melhor a designação de "rickettsioses". Mostrámos tambem que o conceito unicista em relação aos agentes etiologicos das rickettsioses e mesmo o conceito dualista, deve ser substituido por um conceito pluralista. Isto porque a este grupo pertencem, sem duvida, outras infecções, como a febre maculosa das Montanhas Rochosas, a febre marselhesa, a botonosa de Tunis, a tsutsugamushi e o typho exanthematico de São Paulo, entre outras, que se differenciam por varios aspectos, principalmente de caracter experimental e epidemiologico.

Nesta ordem de idéas tambem as "rickettsias" responsaveis pelas varias infecções se differenciariam pelo aspecto clinico destas, pelo comportamento experimental e localização e pelos seus agentes transmissores até que tenhamos em mão outros elementos, até agora não obtidos de um modo praticamente utilizavel para esse fim, como a cultura em meios artificiaes, para sua distincção segundo a technica bacteriologica. Da mesma forma que a simples identidade morphologica e mesmo certa especificidade antigenica, não podem, por si sós, identificar differentes germes em varios grupos microbianos, que se differenciam e se classificam por outros caracteres que podem ser estudados de accordo com a technica moderna, provavelmente os microorganismos responsaveis pelas rickettsioses virão a ser melhor distinguiveis quando possivel se tornar a applicação, em seu estudo systematico, de taes methodos aperfeiçoados. No entanto, os elementos até agora assignalados parecem sufficientes para impôr sua distincção.

Relativamente ao typho exanthematico de S. Paulo, embora não se possa ainda concluir em definitivo, parecem maiores suas relações com o grupo da febre maculosa das Montanhas Rochosas, constituindo, talvez, uma nova modalidade da infecção, em virtude do comportamento experimental do "virus" e outros caracteres que assignalámos.

Assim sendo, até que novos estudos sejam emprehendidos, os "corpusculos de Mooser", que melhor se denominariam *Rickettsia mooseri*, como homenagem ao illustre pesquisador que tão bem os estudou no typho mexicano, deverão considerar-se distinctos da *Rickettsia brasiliensis*, responsavel pelo typho exanthematico de S. Paulo. O mesmo poder-se-á dizer, embora maiores suas affinidades, tambem em relação á *Rickettsia* (*Dermacentroxenus*) *rickettsi* Wolbach, responsavel pela *rickettsiose* das Montanhas Rochosas, assim como em relação ás outras especies descriptas, pertencentes ao genero creado pelo prof. Rocha Lima, responsaveis por outras rickettsioses.

Fizemos um estudo detalhado da rickettsia do typho exanthematico de S. Paulo dando os resultados da pesquisa destes elementos, primeiramente nas cellulas endotheliaes da membrana de Descemet, após a inoculação do "virus" na camara anterior do olho de animaes (cobaia, coelho e *Macacus rhesus*); em seguida, nas cellulas mesotheliaes da parede peritoneal de cobaias após a inoculação do "virus" no peritoneo. Descrevémos a technica que empregámos para a pesquisa da rickettsia e os methodos para a coloração destes elementos (methodo de Castaneda e Giemsa). Assignalámos a morphologia da *Rickettsia brasiliensis*, sendo a descripção documentada com numerosos desenhos e microphotographias.

Relativamente á frequencia da rickettsia nas cellulas da parede peritoneal, após a inoculação do virus no peritoneo, obtivemos resultados positivos em 73,5 % num total de 212 cobaias examinadas. Esta porcentagem é maior quando a pesquisa é feita em occasião favoravel.

Estudámos as relações da rickettsia, já evidentes pela sua frequencia, com a infecção, verificando suas propriedades antigenicas. Mostrámos que a rickettsia, desembaraçada do virus existente no peritoneo, por meio de lavagens e centrifugações successivas, é pathogenica, causando infecção experimental typica e possue evidentes propriedades vaccinantes em relação ao virus. Indicámos a technica para o preparo da vaccina e os resultados da vaccinação de cobaias comparativamente com os negativos obtidos com uma vaccina preparada com o "virus" (cerebro).

Por fim, em experiencias preliminares, mostrámos que a rickettsia, além desta immunidade activa, determina tambem uma immunidade passiva, não sendo irrazoavel alimentar-se esperança no preparo de um soro, sinão dotado de propriedades curativas, pelo menos com poder preventivo e neutralizante em relação ao "virus" e á infecção.

Finalmente, assignalámos a verificação da presença da *Rickettsia brasiliensis* em ovos que se mostraram infectantes e em cortes de carrapato (*Amblyomma cajennense*) que havia sugado um animal infectado e capaz de transmittir, pela picada, a infecção experimental, experiencias estas realizadas com a collaboração de F. da Fonseca e que serão objecto de trabalho especial.

As conclusões dos estudos experimentaes, constantes da 2.ª parte deste trabalho, podem assim ser resumidas:

I. A rickettsia que descrevemos no typho exanthematico de São Paulo, *Rickettsia brasiliensis*, pela sua frequencia e evidentes relações antigenicas que apresenta com a infecção, representa o seu agente etiologico ou uma das phases do "virus".

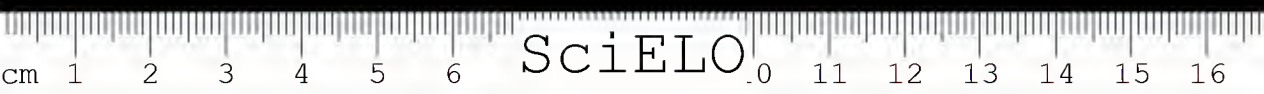
II. Como consequencia da inoculação do virus na camara anterior do olho de certos animaes, a rickettsia pode ser evidenciada nas cellulas endotheliaes da membrana de Descemet.

III. Após a inoculação do virus no peritoneo, a rickettsia se evidencia, de preferencia, nas cellulas mesotheliaes da parede peritoneal.

IV. No peritoneo, num total de 212 cobaias, sua frequencia foi verificada em 73,5% dos animaes, sendo maior quando a pesquisa é feita em periodo favoravel, sendo respectivamente de 71,4%, 100%, 93,7% e 90,4% nos animaes sacrificados antes da reacção febril, no 1.º, no 2.º e no 3.º dia de reacção, e de 55,5% nos sacrificados depois do 4.º dia de reacção febril.

V. A rickettsia encontrada no peritoneo é dotada de pathogenicidade, provocando infecção experimental caracteristica quando, desembaraçada do virus por meio de lavagens e centrifugações successivas, é inoculada em cobaias.

VI. A rickettsia possue propriedades antigenicas em relação ao "virus", podendo-se obter uma immunização activa de cobaias com uma vaccina com ella preparada, e tambem determina a formação de anticorpos virucidas em animaes immunizados.

VII. A *Rickettsia brasiliensis* foi verificada, em cortes, no organismo de carrapato (*Amblyomma cajennense*) infectado experimentalmente e que consideramos o mais provavel transmissor da infecção. Esta conclusão é baseada em estudos experimentaes que serão relatados em outro trabalho, onde será tambem estudada a disposição e localização da *Rickettsia* nos carrapatos infectados.

STUDIES OF THE SÃO PAULO TYPHUS

BY

J. LEMOS MONTEIRO

With 54 charts, 6 plates with 9 photographs, of which 1 in colours, 2 microphotographs and 17 drawings.

GENERAL SUMMARY

PART I

Experimental behaviour and properties of the virus

ABSTRACT

Part I

I. The present paper is the result of researches, made during the year of 1931 and the first semester of 1932, most of which have been summarized in a series of notes published in "Brasil-Medico", some, however, having been presented to the 2nd International Congress of Comparative Pathology, held in Paris in October 1931. Such features of the São Paulo typhus as its transmissiveness, hosts to the virus in nature, etc., have likewise been investigated in coöperation with other assistants at the Instituto Butantan; a résumé of such investigations has also been published as presented to the "Sociedade de Medicina e Cirurgia de São Paulo" (Laboratory Week, January, 1932) and to the "Sociedade de Biologia de São Paulo", the subjects dealt with at those meetings having, nevertheless, been more throroughly analysed elsewhere.

This English translation covers but those chapters which deal particularly with the Author's personal contribution from an experimental standpoint and those in which his views are set forth as to the character of the typhus problem in our midst. The remaining points referred to in the General Summary together with the detailed protocols of the experiments made may be found in the Portuguese text.

— Since 1929, when it was diagnosed, there has appeared in São Paulo an infection of the group of the "exanthematic fevers", which, however, has its own individuality, as per its clinical and epidemiological feature and behaviour under experimental conditions. In the present paper, which is divided into two parts and ten chapters, the *São Paulo typhus* is analysed with regard to the experimental behaviour of its "virus" on animals and to its etiological feature as well, which includes a description and a study of its relationship with the responsible rickettsia, *Rickettsia brasiliensis* Monteiro, 1931.

The designations "typho endemico de S. Paulo" (S. Paulo endemic typhus) and "typho exanthematico de S. Paulo" (S. Paulo exanthematic typhus) had

been adopted but the name "S. Paulo typhus" is now used in their stead to be in conformity with the English nomenclature of this group of diseases.

A comparative study of the exanthematic fevers thus far reported in several countries of the western world gives ground for the S. Paulo typhus to be considered as distinct from any of these fevers as it is from the European or epidemic typhus.

II. In regard to the experimental infectiousness of the virus for the various laboratory animals, it seems to be most marked in the guinea-pig since the virus produces, on inoculation into this animal and after an incubation period of 3 to 4 days, a febrile reaction lasting generally from 3 to 8 days and ending by death in about 70% of the cases. Just before death the temperature of the infected guinea-pigs drops to below normal, sometimes rising for a while to drop definitely. In case of recovery their temperature returns to normal and they resist further inoculation of the active virus thus showing to have acquired immunity. This may last for at least 3 months but is not indefinite as it gradually decreases and disappears, the guinea-pigs becoming again susceptible to the virus.

Among the anatomical lesions found in guinea-pigs inoculated with the virus the spleen enlargement is most marked and constant; subcutaneous hemorrhages with jelly-like oedema may also occur especially at the inguinal regions when scrotum inflammation is present; histological alterations such as nodular lesions of the brain seem to be rare or absent contrary to what prevails in the European typhus.

Upon intraperitoneal inoculation male guinea-pigs develop in 20 to 25% of the instances a reaction characterized by swelling of the scrotum, either light with but reddening and oedema, or marked, sometimes with great enlargement, petechiae and purpura, testicle retention and even necrosis of the local skin.

The behaviour of the S. Paulo typhus as regards the guinea-pig serves as a means of distinction of this infection from other types of exanthematic fevers. In this respect the former may indeed be separated from the classical typhus, pathogenically by its shorter period of incubation and fever and greater severity, and histologically by the absence or great rarity of brain nodular lesions. This may be due to a more rapid evolution in the S. Paulo typhus which in this respect resembles certain forms of North American endemic typhus. However, the S. Paulo typhus also differs from both the North American endemic typhus and the "tobardillo" not only in bearing a somewhat shorter pyrexia but also in being followed by scrotum reaction in a lower proportion of the cases: 20 to 25% as against 90% (Maxcy) in the Southern typhus of the United States and 70% (Neill) to 92.5% (Mooser) in the Mexican typhus. Moreover, hemorrhages in the scrotum and even in some

other bare regions (foot plants) are more frequent in our typhus and are complicated, although seldom, by necrosis of the local skin. The virus of both the North American and the S. Paulo typhuses cause this scrotum reaction in guinea-pigs only upon intraperitoneal inoculation, whilst that of the Rocky Mountain spotted fever causes it even on hypodermic injection due to its more marked tropism for the scrotum and apparently greater hemorrhagiparous and cytolytic power.

Rabbits are more resistant as they develop a rather short feverish reaction, preceeded by a short incubation and seldom followed by death. Rats generally undergo an inapparent infection.

III. The inoculation of the S. Paulo virus into *Silenus rhesus* monkeys is followed by a 2-4 day incubation period and a typical pyrexia usually lasting 4 days and ending in collapsus and death; in some specimens the infection is more severe and appears complicated with hemorrhagic phenomena (face, scrotum, etc.) particularly accentuated on their last day of life and right after death.Other simia, such as *Cebus* and *Alouatta*, seem also to be susceptible, although the number of inoculations is not sufficient to permit a conclusion.

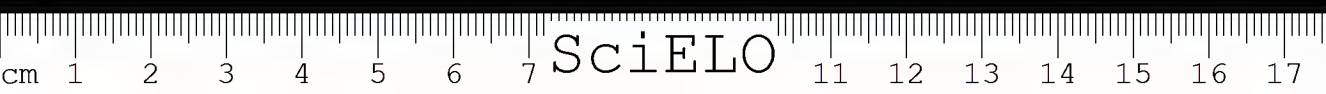
IV. Inoculation into the anterior chamber of the eye of guinea-pigs, rabbits and *rhesus* monkeys brings about not only a characteristic ocular reaction but a feverish general infection similar to that which ensues its intraperitoneal inoculation. That such reactions are specific is shown by the successful transfer of the virus to normal animals by means of an injection of either blood or brain emulsion of guinea-pigs thus infected as well as by the resistance to the virus as injected into the eye on the part of guinea-pigs that were already immune; it is also shown by the serial transfer, by the eye channel, of the virus as contained in the aqueous humour of an animal already ocularly infected.

V. Comparatively with the real filterable viruses the agent of the São Paulo typhus bears the following peculiar properties:

a) it did not pass through the L3 and L5 Chamberland, 7 lb. Mandler and N Berkefeld filters when it was found in citrated blood, or brain emulsion in saline or in glucose broth, under the conditions described in the text;

b) it seemed not to infect guinea-pigs when a drop of virulent brain emulsion, in a concentration capable of causing a typical infection by any other channel, was placed on their normal eye mucosa;

c) its M. I. D. (minimum infecting dose) corresponded to a dilution greater than 1 per 10000 and lesser than 1 per 1000000 of brain emulsion;

d) when found in the blood or brain dried in vacuum over sulfuric acid and kept in vacuum below 0°C it lost its virulence in less than 24 hours, becoming apt to cause but a mild infection ad immunity in guinea-pigs;

e) in 6 days it was already dead and caused not even immunity;

f) preserved in pure glycerin at 5°C it (virulent brain) lost its virulence in less than 7 days; in 50% glycerin at the same temperature it lost both vitality and virulence in more than 12 and less than 24 days;

g) in frozen brain it has been preserved for about 1 year; therefore, the freezing of virulent brains represents the best means for both the conservation in laboratory and transportation of the virus as it is cheaper than the maintenance by successive transfers from animal to animal.

VI. In view of its clinical, experimental and epidemiological peculiarities, the S. Paulo typhus should be given individuality to be placed, together with the Rocky Mountain spotted fever, the eruptive fever and the tick-bite fever, in one of the subgroups now recognized in the exanthematic fevers. The other subgroups would be represented respectively by those infections which bear the European or classical typhus as type and by the "tsutsugamushi" and allied infections in which the larvae of certain trombidiid play the rôle of virus carriers.

Indeed, in spite of Mooser's arguments, in favour of the reciprocal reversibleness of the viruses of the epidemic and endemic typhuses, that pluralistic concept seems to be more in conformity with various facts of scientific observation regarding the etio-pathogeny of the exanthematic fevers.

Part II

This section deals with the rickettsia found in the S. Paulo typhus, its frequency and relationship with the experimental infection.

From a nomenclatural standpoint the group of infections called "exanthematic fevers" no doubt must be separated from the diseases caused by real filterable viruses so as to form a special group for which the name "rickettsiosis" seems to be fitting.

From an etio-pathogenic standpoint this group should be subdivided, as shown before, into at least three subgroups. This pluralistic conception seems to be fully justified, not only by the clinical feature of the corresponding infections but by the experimental infectiousness, localization and transmissiveness of their respective *Rickettsiae* as well, until other means such as cultivation of these organisms in artificial media be made accessible to be applied to their differentiation. Until some more satisfactory methods based in the modern laboratory technic be developed, the S. Paulo typhus individualization must be based on the evidence at hand as already shown. In view of the experimental behaviour and other characteristics of its "virus" this disease seems to be mostly related to the Rocky Mountain spotted fever of which it may represent a new variety.

In the light of the newer knowledge of the various rickettsia-like organisms it seems indicated for the so-called "Mooser's bodies" to be named *Rickettsia mooseri* after the distinguished investigator who so well studied them in the Mexican typhus. In this respect there is little doubt but that this *Rickettsia* be different from that found in the S. Paulo typhus, which, although much closer to, seems to be also distinct from, *R.* (*Dermacentroxenus*) *rickettsi* Wolbach, responsible for the Rocky Mountain spotted fever.

The detailed study of the rickettsiae of the S. Paulo typhus is based a) on their aspect in the endothelial cells of Descemet's membrane after inoculation of the "virus" into the anterior chamber of the eye of guinea-pigs, rabbits and *rhesus* monkeys and also in the mesothelial cells of the peritoneal wall after intraperitoneal inoculation and b) on their morphology after staining by Castaneda's and Giemsa's methods as found in the enclosed drawings and microphotographs. This study shows that *R. brasiliensis* Monteiro, 1931 may be found in the mesothelial cells of the peritoneal wall of 73,5% out of 212 guinea-pigs intraperitoneally inoculated and examined, that this percentage is still higher when the research is made at the right moment. These cell contained or free rickettsiae, after repeated washing and centrifuging to free them from the "virus" perchance existing in the peritoneum, again set up the disease upon injection into normal guinea-pigs; likewise, a bacterin prepared with them contrary to what occurs if brain material is used, is capable of producing immunity by the formation of virucidal antibodies. The S. Paulo rickettsia antigenic power is proven by this capacity to bring about active immunity and to confer passive immunity as well so as to make possible the preparation of an anti-serum, if not curative, at least preventive as regards the virus or the infection.

Finally, the presence of *R. brasiliensis* has been disclosed not only in sections of ticks (*Amblyomma cajennense*) that have fed on infected guinea-pigs but in their eggs that also prove to be infecting, this tick being able to carry the infection under experimental conditions.

From these experiments the following conclusions may be drawn:

a) *Rickettsia brasiliensis* represents either the causative agent or one of the stages of the "virus" of the S. Paulo typhus in view of its frequency and antigenic relationship with this infection;

b) it occurs in the endothelial cells of Descemet's membrane after inoculation of the virus into the anterior chamber of the eye of certain laboratory animals as well as in the mesothelial cells of the peritoneal wall after intraperitoneal inoculation;

c) in the latter instance its frequency reaches 73,5% of the guinea-pigs inoculated, but this incidence is still higher if the research is made at a more

favourable period: 90,4% on the 3rd day of reaction, 93,7% on the 2nd day and 100% on the 1st day.

d) it is also decidedly pathogenic for guinea-pigs in which it causes a typical infection experimentally even though it be previously freed from the "virus" by repeated washing and centrifuging;

e) it bears antigenic properties and so may be used in the preparation of a bacterin to be applied in actively immunizing guinea-pigs and in stimulating the formation of specific virucidal antibodies;

f) it has been found in sections of experimentally infected ticks (*A. cajennense*), which seem to be the most likely carrier of the S. Paulo typhus under natural conditions.

BIBLIOGRAPHIA

I.ª Parte

1. *Brill, N. E.* — Amer. J. Med. Sc. CXXXIX:484.1910.
2. *Anderson, J. F. & Goldberger, J.* — Publ. Health Rep. XXVII(5):149.1912.
3. *Maxey, K. F.* — Publ. Health Rep. XLI:2967.1926; XLIII(47:3084.1928; XLIV(11):589.1929.
4. *Mooser, H.* — J. Inf. Dis. XLIV(3):156.1929
5. *Mooser, H.* — J. Inf. Dis. XLIII (3):241.1928.
6. *Badger, L. F., Dyer, R. E. & Rumreich, A.* — Publ. Health Rep. XLVI(9):463.1931.
7. *Battaglia, M. I. & Barbará, B.* — Rev. Inst. Bact. (Buenos Aires) II(1):35.1919.
8. *Kraus, R.* — Rev. Inst. Bact. (Buenos Aires) II(6):1.1921.
9. *Piza, J. T., Salles Gomes, F. & L., Fleury, J. P., Meyer, J. R., Castro, J. O., Rodrigues, C. & Rocha Lima, H. da* — C. R. Soc. Biol. CVI(11):1020.1931.
10. *Monteiro, J. Lemos* — C. R. Soc. Biol CVII(23):1161.1931
11. *Kraus, R. & Barrera, J. M.* — Rev. Inst. Bact. (Buenos Aires) II(6):55.1921.
12. *Dyer, R. E., Badger, L. F. & Rumreich, A.* — J. A. M. A. XCVII(9):589.1931.
13. *Fletcher, W.* — Proc. R. Soc. Med. (Sect. Epid) XXIII:37.1930.
14. *Felix, A. & Rhodes, M.* — J. of Hyg. XXXI(2):225.1931.
15. *Pijper, A. & Dau, H.* — Brit. J. Exp. Path. XII(3):123.1931.
16. *Shelmire, B. & Dove, W. E.* — J. A. M. A. XCVI(8):579.1931.
17. *Monteiro, J. Lemos* — C. R. Soc. Biol. CVIII(30):521.1931; Brasil-Medico XLV(35):805.1931.
18. *Nicolle, Ch., Conseil, E. & Conor, A.* — Ann. Inst. Pasteur XXVI(5):250.1912.
19. *Cavino, A. & Girard, J.* — Centr. f. Bakt., Abt. I, Ref. LIII:342.1911.
20. *Monteiro, J. Lemos* — Brasil-Medico XLV(48):1109.1931.
21. *Maxey, K. F.* — Publ. Health Rep. XLIV(11):589.1929.
22. *Neill, M. H.* — Publ. Health Rep. XXXII(28):1105.1917.
23. *Dyer, R. E., Rumreich, A. S. & Badger, L. F.* — J. A. M. A. XCVII(9):589.1931.
24. *Monteiro, J. Lemos* — Brasil-Medico XLV(49):1140 1931.
25. *Nagayo, M., Tamiya, T., Mitamura, T., & Sato, K.* — Japan. J. Exp. Med. VIII(4):309.1930.
26. *Nagayo, M., Tamiya, T., Mitamura, T., & Hazato, H.* — Japan. J. Exp. Med. VIII(4):319.1930.
27. *Monteiro, J. Lemos* — Brasil-Medico XLV(50):1163.1931.
28. *Monteiro, J. Lemos* — Brasil-Medico XLV(51):1188.1931.
29. *Monteiro, J. Lemos & Godinho, R.* — Mem. Inst. Butantan V.1930.
30. *Ricketts, H. & Wilder, M. R.* — J. A. M. A. LIV:463.1931.
31. *Olitsky, P.* — J. Inf. Dis. XX:349.1917.
32. *Zinsser, H. & Batchelder, A. P.* — J. Exp. Med. LI(6):847.1931.
33. *Nicolle, A., Conor, A., & Conseil, E.* — Ann. Inst. Pasteur XXV(2):97.1911.

34. *Nicolle, Ch. & Laboilly, Ch.* — Arch. Inst. Pasteur Tunis XIV (2) :213.1925.
35. *Sparrow, H. & Lombroso, U.* — Arch. Inst. Pasteur Tunis VIII(1) :1.1929.
36. *Nicolau, S., Galloway, J. A. & Kopciowska, L.* — C. R. Soc. Biol. CVII(14) :30.1931.
37. *Aragão, H. B. & Costa Lima, J.* — Suppl. Mem. Inst. O. Cruz (8).1929.
38. *Monteiro, J. Lemos* — Brasil-Medico XLIII(35) :1037.1929; Mem. Inst. Butantan V.1931
39. *Mooser, H.* — Gazeta Med. de Mexico LXIII(4) :181.1932.
40. *Monteiro, J. Lemos & Fonseca, F. da* — Comm. á Soc. Biol. de S. Paulo, Sessão de 8-VII-1932; Brasil-Medico XLVI(3) :3.1932.

2.ª Parte

41. *Nicolle, Ch. & Sparrow, H.* — Bull. Inst. Pasteur (Revue) XXIX(20) :945.1931.
42. *Monteiro, J. Lemos* — Brasil-Medico XLV(47) :1096.1931; XLV(48) :1109.1931: XLV(49) :1140.1930.
43. *Rocha Lima, H.* — Münch. mediz. Wochenscr. 1:33.1917.
44. *Rocha Lima, H.* — Rickettsien. Sep. do Handbuch der pathogenen Mikroorganismen (Kolle & Wassermann) VIII(45).1930.
45. *Kodama, M. Kono, M. & Takashi, K.* — Kitasato Arch. Exp. Med. IX(2) :91 e 97.1932.
46. *Nagayo, M., Tamiya, T., Mitamura, T. & Sato, K.* — Japan. J. Exp. Med. VIII(4) :309.1930.
47. *Nagayo, M., Miyagawa, Y., Mitamura, T., Tamiya, T., Sato, K., Hasato, H., & Imamura, A.* — Japan. J. Exp. Med. IX(2) :87.1931.
48. *Nagayo, M., Tamiya, T., Mitaumura, T. & Hazato, T.* — Japan. J. Exp. Med. VIII(4) :319.1930.
49. *Monteiro, J. Lemos* — C. R. Soc. Biol. CVII(23) :1161.1931; Brasil-Medico XLV(21) :468.1931; XLV(50) :1163.1931.
50. *Zinsser, H. & Castaneda, M. R.* — J. Exp. Med. LII(5) :649.1930.
51. *Monteiro, J. Lemos* — C. R. Soc. Biol. CVIII(30) :521.1931; Brasil-Medico XLV(35) :805.1931.
52. *Castaneda, M. R.* — J. Inf. Dis. XLVII(5) :416.1930.
53. *Pinkerton, H.* — J. Exp. Med. LIV(2) :187.1931.
54. *Zinsser, H. & Castaneda, M. R.* — J. Exp. Med. LII(3) :325.1931.
55. *Spencer, R. R. & Parker, R. R.* — Publ. Heath Rep. XLI(35).1926.
56. *Connor, C. L.* — J. Immunology IX(4) :269.1924.
57. *Zinsser, H. & Castaneda, M. R.* — J. Exp. Med. LIII(3) :325.1931.
58. *Zinsser, H. & Castaneda, M. R.* — J. Exp. Med. LII(5) :649.1931.
59. *Zinsser, H. & Castaneda, M. R.* — J. Exp. Med. LIII(3) :333.1931.
60. *Zinsser, H. & Castaneda, M. R.* — Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. XXIX(7) :840.1932.
61. *Nicolle, Ch. & Conseil, E.* — Ann. Inst. Pasteur XXV(1) :46.1911.
62. *Zinsser, H. & Batchelder, A. P.* — J. Exp. Med. LI(6) :847.1930.
63. *Nicolle, Ch. & Conseil, E.* — Arch. Inst. Pasteur Tunis XIV(4) :355.1925.
64. *Monteiro, J. Lemos; Fonseca, F. da & Prado, A.* — Brasil-Medico XLVI(3) :49.1932.
65. *Monteiro, J. Lemos; Fonseca, F. da & Prado, A.* — Brasil-Medico XLVI(8) :169.1932.
66. *Monteiro, J. Lemos; Fonseca, F. da & Prado, A.* — Brasil-MedicoXLVI(9) :193.1932.
67. *Monteiro, J. Lemos; & Fonseca, F. da* — Comm. á Soc. de Biol. de S. Paulo, (Sessão 8-VII-1932). Brasil-Medico XLVI(48) :993.1932.

(Trabalho da Secção de Virus e Virustherapia do Instituto Butantan, Julho de 1932).

LEGENDA DAS GRAVURAS

Estampa I

Figs. 1.2 — Reacção escrotal de pequena intensidade.
Figs. 3, 4 — Reacção escrotal mais accentuada: frente e perfil.

Estampa II

Figs. 1, 2 — Reacção escrotal intensa, vendo-se melhor, na figura 2, ampliada, as zonas de hemorrhagia e necrose.
Figs. 3, 4 — Reacção escrotal intensa em cobaia, com phenomenos hemorrhagicos e necrose da pelle.

Estampa III

Fig. 1 — Photographia colorida da Est. II, fig. 2, salientando o aspecto da reacção.
Fig. 2 — Reacção escrotal intensa em outra cobaia, com phenomenos hemorrhagicos cutaneos: o processo terminou pela necrose da pelle.

Estampa IV

Figs. 1, 2, 3, 4 — Aspectos da *Rickettsia brasiliensis* em diversas cellulas colhidas, pela raspagem da membrana de Descemet, em animaes inoculados com o "virus" na camara anterior do olho: coloração de Castaneda.
Fig. 5 — Elementos mais ou menos filamentosos, observados em uma cellula da membrana de Descemet: coloração de Castaneda.
Figs. 6, 7 — Cellulas da membrana de Descemet contendo rickettsias: coloração de Giemsa.

Estampa V

Figs. 1, 2, 3, 4 — Aspectos da *Rickettsia brasiliensis* em cellulas mesotheliaes da parede peritoneal de cobaias inoculadas com o "virus" pelo peritoneo. Coloração de Castaneda
Fig. 5 — Campo microscopico de identico material: duas cellulas com rickettsias; um polycariócyto com esses elementos. Coloração de Castaneda.
Figs. 6, 7, 8 — Cellulas mesotheliaes da parede peritoneal com rickettsias. Coloração de Giemsa.
Fig. 9 — Parte de um campo microscopico, revelando diversas cellulas com rickettsias.

Estampa VI

Figs. 1, 2 — Microphotographias de duas cellulas mesotheliaes da parede peritoneal, ricas em rickettsias: a figura 1 corresponde ao desenho representado pela Estampa V, fig. 8.

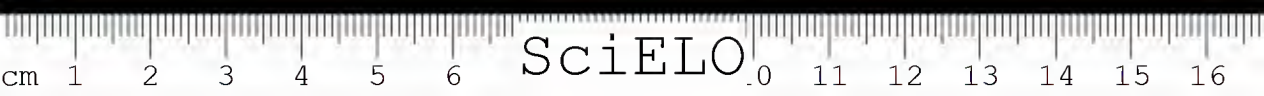
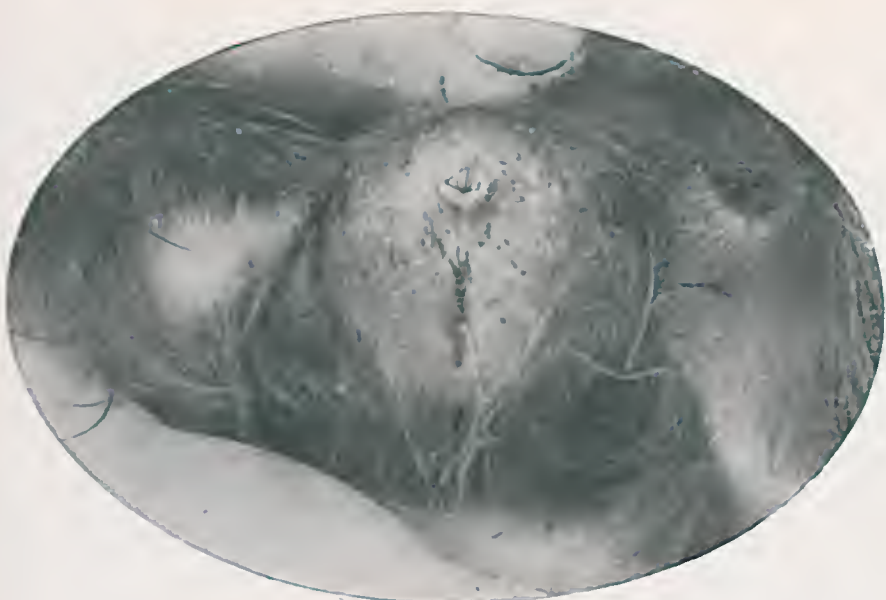
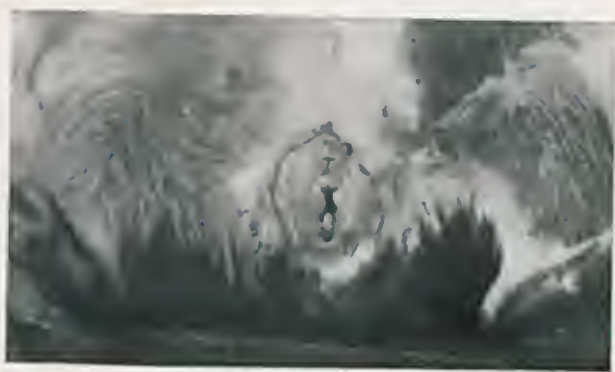
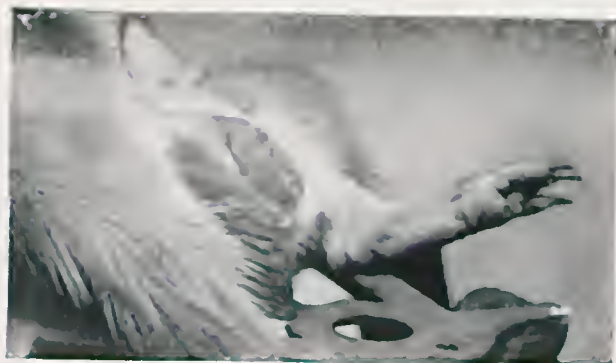
Mem. Inst. Butantan
Vol. VI, 1931

ESTAMPA I

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

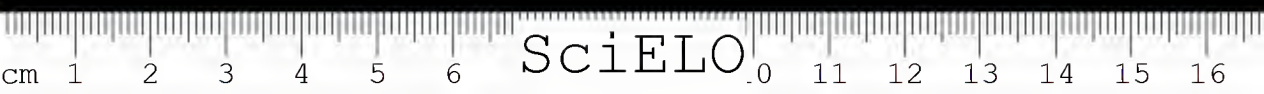
Fig. 4

ESTAMPA II

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

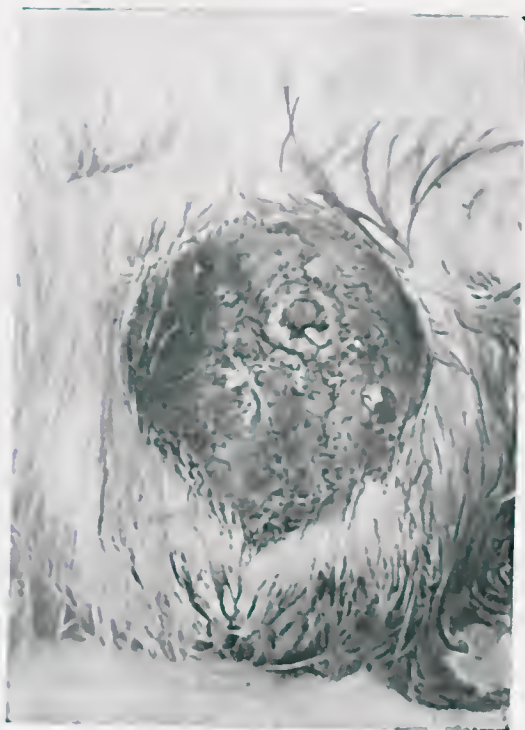
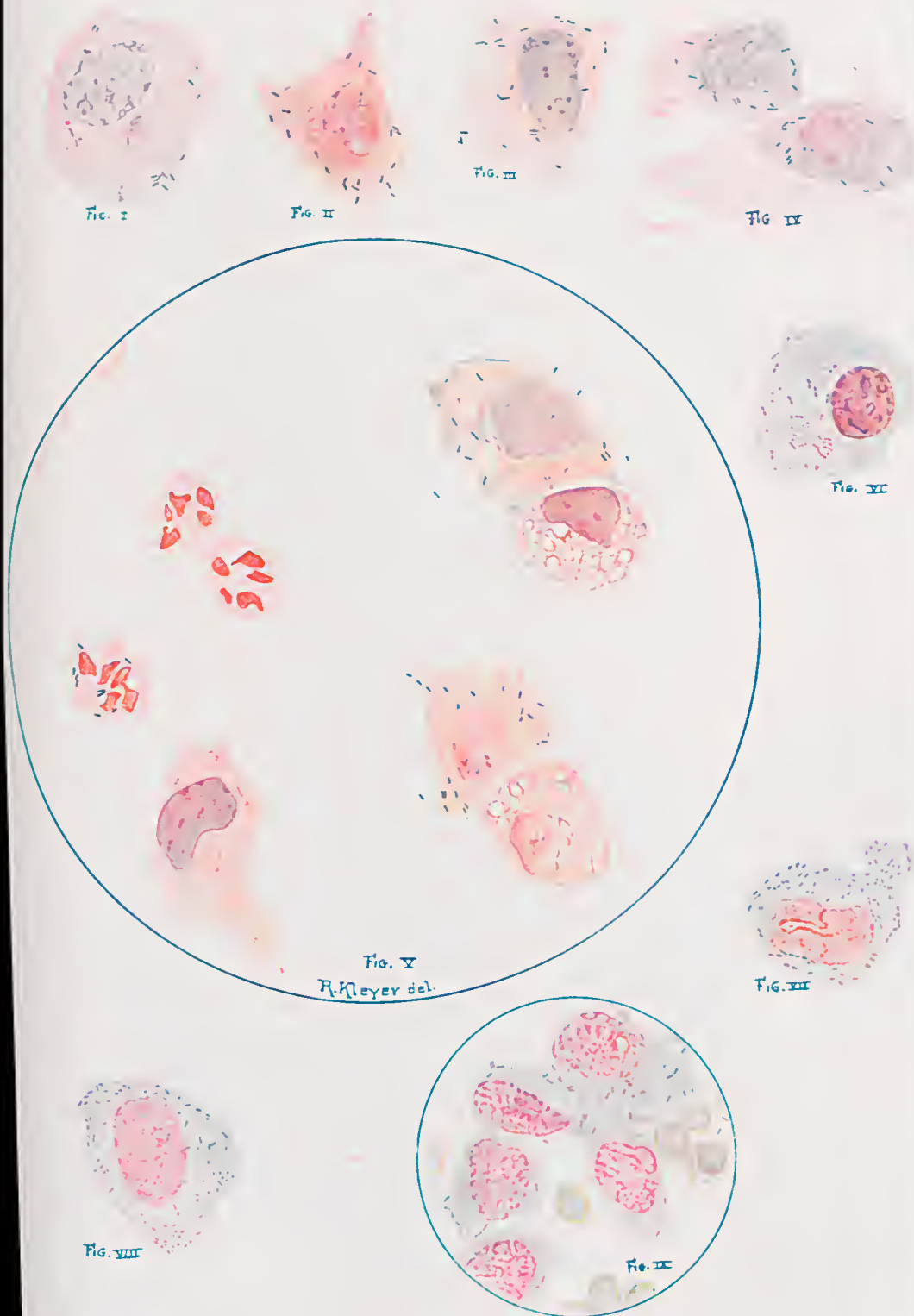
Mem. Inst. Butantan
Vol. VI, 1931

ESTAMPA III

Fig. I

Fig. II

Mem. Inst. Butantan
Vol. VI, 1931

ESTAMPA V

ESTAMPA VI

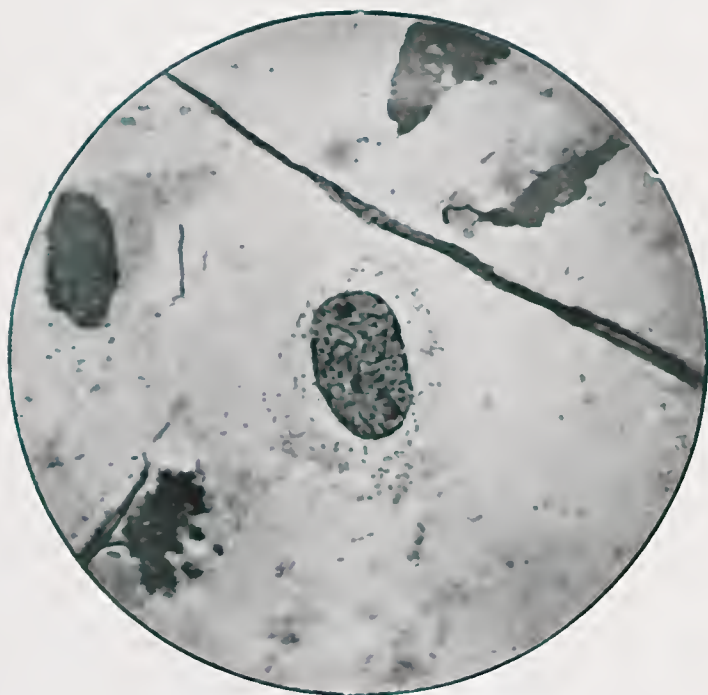



Fig. 1

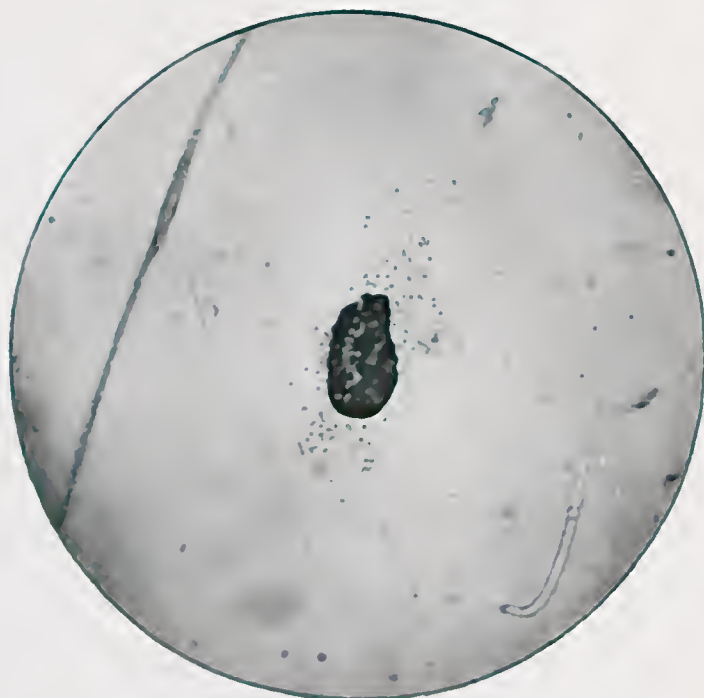



Fig. 2

PESQUISAS EPIDEMIOLOGICAS SOBRE O TYPHO EXANTHEMATICO DE SÃO PAULO

POR

J. LEMOS MONTEIRO, F. DA FONSECA E ALCIDES PRADO

(Com 10 graphicos e 2 photographias)

614.526

PESQUISAS EPIDEMIOLOGICAS SOBRE O TYPHO EXANTHEMATICO DE SÃO PAULO

POR

J. LEMOS MONTEIRO, F. DA FONSECA E ALCIDES PRADO

I

Possibilidade da transmissão experimental do virus por *Ixodidae*

Como consequencia do interesse ultimamente observado pelo typho exanthematico, appareceram na literatura deste anno varios trabalhos referentes á possibilidade de infecção, natural ou experimental, de carrapatos com virus de varias das modalidades dessa molestia.

Depois dos trabalhos fundamentaes que demonstraram ser a febre das Montanhas Rochosas transmittida por Ixodideos e de verificação semelhante feita sobre uma infecção dos ruminantes (heart-water), a primeira demonstração da transmissão de infecções deste grupo por carrapato foi dada, no corrente anno, por Paul Durand e E. Conseil (1), no Instituto Pasteur de Tunis, ficando provado que o virus da febre botonosa se encontra no *Rhipicephalus sanguineus* Latr., carrapato muito commum, e, que, capturado sobre o cão, triturado e inoculado no homem, reproduz a infecção. Verificaram ainda estes pesquisadores que o virus pode permanecer varias semanas no *Rhipicephalus sanguineus.*

Ainda este anno verificaram Georges Blanc e J. Caminopetros (2) que a infecção é transmittida hereditariamente pela femea do *Rhipicephalus sanguineus* á sua prole, sendo infectantes, não só os ovos, como as larvas delles oriundas, verificação esta da mais alta importancia para a epidemiologia da infecção, pois vinha mostrar a desnecessidade do contacto do carrapato infectante com o doente, a possibilidade de grande propagação da infecção, bem como a possibilidade da persistencia do virus em determinadas regiões, mesmo na ausencia de doentes.

Charles Joyeux e J. Pieri, finalmente (3), acabam de verificar que o *Rhipicephalus sanguineus* pode conservar durante lapso de tempo relativamente

longo o virus da febre exanthematica mediterranea, ainda se mostrando infectante depois de hibernar durante uma parte do anno.

Não só em relação á forma mediterranea do typho exanthematico possuimos hoje dados sobre o papel desempenhado pelos carrapatos; tambem os temos sobre o typho endemico norte-americano. Hans Zinsser e Ruiz Castaneda (4) conseguem infectar experimentalmente carrapatos (*Dermacentor nitens, Dermacentor andersoni* e *Amblyomma* sp.) com o virus e transmittir a infecção a animaes de laboratorio, verificando que os carrapatos podem permanecer infectados durante o lapso de 14 dias.

Experiencias negativas não têm, certamente, faltado. Mooser e Dummer (5), trabalhando com o typho dos Estados do Atlantico do Sul, não conseguiram infectar, fazendo-os sugar cobaias doentes, os seguintes carrapatos: *Amblyomma americanum, Amblyomma cajennense, Rhipicephalus sanguineus, Ornithodoros talaje* e *Ornithodoros turicata*

Interessado o Instituto Butantan, na pesquisa da modalidade paulista do "typhus", que nelle vem sendo estudado desde o inicio de 1931 por um dos signatarios do presente trabalho, decidimos emprehender algumas experiencias no sentido de verificar si os *Ixodidae* tambem são sensiveis ao virus brasileiro, que sob muitos aspectos differe do europeu e mesmo do norte-americano.

O presente trabalho representa o relatorio das verificações emprehendidas.

Technica empregada

Utilizámos nestas pesquisas *Ixodidae* pertencentes á sub-familia *Argasinae*, o *Ornithodoros rostratus* Aragão e o *Argas persicus* (Oken) e á sub-familia *Ixodidae*: o *Amblyomma cajennense* (Fabr.).

A technica seguida para a inoculação dos carrapatos constou de lavagem em solução physiologica dos exemplares a utilizar, trituração destes em gral com solução isotonica, filtração através de gaze e consecutiva inoculação na cavidade peritoneal de cobaias. As experiencias de picadas foram feitas com numerosas larvas de *Amblyomma cajennense* collocadas sobre cobaias cujos pelos do dorso tinham sido previamente raspados e deixadas para sugar por espaço de 2 dias, quando se colheram os exemplares, cheios ou não, aliás encontrados em numero reduzido. As experiencias de picada com *Ornithodoros rostratus* foram acompanhadas de perto durante todo o tempo, o que é facil, sabido como é que este Ixodida suga rapidamente, abandonando o hospedeiro em 1 ou 2 horas, mais ou menos (figs. 1 e 2). As cobaias que serviram á infecção dos carrapatos achavam-se sempre em plena phase de reacção febril.

A verificação da immunidade, praticada em todas as cobaias, era feita sempre com testemunhas normaes, que, sem excepções, funccionaram regularmente.

Praticava-se essa prova depois de submetter as cobaias em experiencias a rigoroso controle, durante pelo menos 20 dias, constando de curva thermica traçada durante todo o periodo de observação e verificação do apparecimento de reacção escrotal e passagem do virus para novo animal, no caso de reacção febril. Depois de decorrido o necessario lapso de tempo, eram os animaes em experiencias submettidos á prova de immunidade, inoculando-se-lhes emulsão de cerebro de cobaias seguramente infectadas com o virus, em dose perto de 1000 vezes superior á necessaria para determinar a infecção de cobaias normaes, controlando-se a inoculação, como já ficou dito, com varias testemunhas. A observação era então proseguida nos mesmos moldes já citados até a morte do animal ou durante lapso de tempo sempre superior a 1 mês, quando estes sobreviviam. Morto o animal, era necropsiado, verificando-se as dimensões do baço e a existencia de derrames cavitarios, fazendo-se a pesquisa de ricketisias no raspado do peritoneo e conservando-se material para exame histo-pathologico, bem como para verificação parasitologicas e bacteriologicas, sempre que havia suspeita de infecção concomitante.

Ao iniciar estas experiencias, fizemos inoculação de 6 *Amblyomma cajennense* normaes, capturados sobre cavallos do Instituto, em uma cobaia, para verificar si a inoculação deste material provocava, nos animaes inoculados, alguma reacção que pudesse perturbar as observações. Não sendo verificada reacção alguma, febril ou outra, durante 25 dias, foi esta testemunha submettida á infecção com material de *Silenus rhesus* (syn. *Macacus rhesus*) infectado, reagindo typicamente ao cabo de 6 dias.

Parte experimental

Para maior clareza, dividimos as experiencias que realizámos segundo o material utilizado e o fim que se tinha em vista.

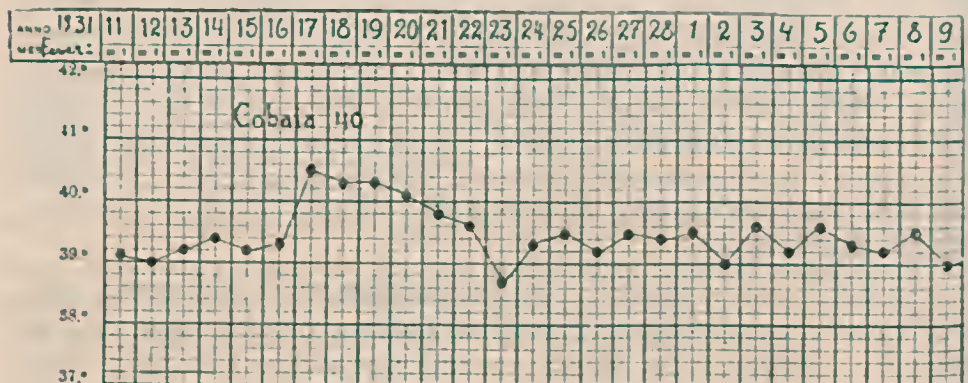
1) Experiencias com *Amblyomma cajennense* (Fabr.).
   a) Receptividade ao virus
   b) Poder infectante das fezes.
   c) Transmissão hereditaria do virus.
2) Experiencias com *Argas persicus* (Oken).
3) Experiencias com *Ornithodoros rostratus* Aragão.
   a) Receptividade ao virus.
   b) Transmissão por picada.
   c) Duração do poder infectante.
   d) Poder infectante do liquido coxal.

1) Experiencias com *Amblyomma cajennense* (Fabr.)

Os exemplares de *Amblyomma cajennense* utilizados nas experiencias foram obtidos de cavallos do Instituto, onde são frequentes.

a) Receptividade do *Amblyomma cajennense*.

Foram feitas 3 tentativas de infecção, inoculando-se 2, 3 e 1 exemplares de *A. cajennense*, respectivamente nas cobaias 39, 40 e 97, os quaes tinham sido alimentados havia 11, 13 e 60 dias na cobaia infectada n.° 19.

Destas apenas reagiu, mostrando-se infectada, a cobaia n.° 40, que apresen-

Graphico 1

tou reacção typica do 6.° ao 10.° dia após a inoculação dos carrapatos, como se verifica pelo graphico n.° 1, tendo-se mostrado, além disso, immune a uma segunda inoculação, em dose seguramente infectante do virus, praticada 1 mês após a primeira. As cobaias 39 e 97 morreram, respectivamente, 5 e 1 dia após a inoculação dos carrapatos, o que prejudicou a observação.

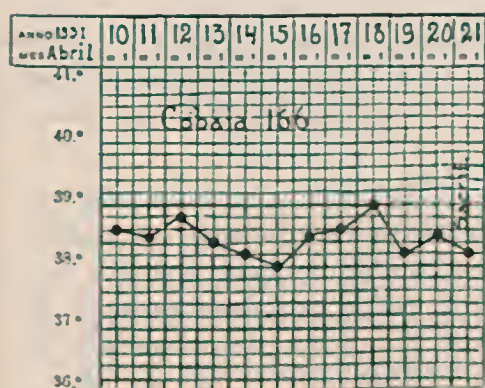
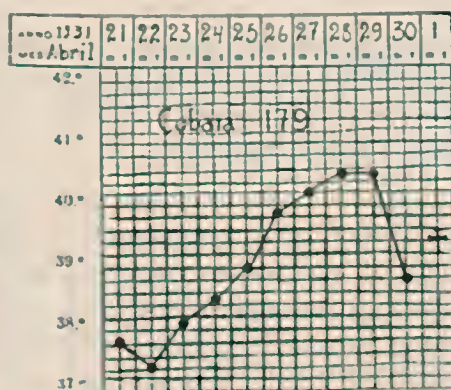
Ficou assim demonstrado que o *Amblyomma cajennense*, alimentado em cobaia infectante em periodo febril, pode conservar em seu organismo, pelo espaço de 13 dias pelo menos, o germe do typho exanthematico de São Paulo. Que se trata, não de simples conservação do virus no organismo do carrapato, mas de verdadeira infecção do acariano, demonstra-o a experiencia c), bem como o facto de ser provavelmente insufficiente a dose de sangue ingerida pelo acariano para provocar infecção na cobaia.

b) Poder infectante das fezes do *Amblyomma cajennense*.

Com o fim de verificar si o virus não só permaneceria no organismo, mas si era tambem eliminado com os excreta, foi feita uma experiencia nos moldes habituaes, aproveitando-se fezes emittidas nos 3 primeiros dias que se seguiram á infecção do Ixodida, tendo sido negativos os resultados. O pequeno prazo decorrido entre a ingestão do sangue e o periodo em que puderam ser colhidas as fezes, porém, não auctoriza a conclusão alguma sobre a passagem do virus pelas fezes.

c) Transmissão hereditaria da infecção ás larvas do *Amblyomma cajennense*.

Para verificar si a prole dos carrapatos submettidos á refeição infectante adquire hereditariamente a infecção, como succede frequentes vezes em outras parasitoses, instituiram-se 5 experiencias, das quaes 3 com inoculação na cavidade peritoneal de larvas provenientes de exemplar de *Amblyomma* infectado e 2 expondo cobaia normaes ás picadas das larvas.

A unica experiencia positiva foi a feita com a cobaia n.° 166, inoculada com emulsão de 10 larvas provenientes de ovos postos por uma femea de *Amblyomma* infectada na cobaia 19, cerca de 2 meses antes, larvas estas que já haviam sido alimentadas em cobaia normal. A cobaia 166 não apresentou reacção até 11 dias depois de inoculada, o que nos levou a sacrifical-a, inoculando a emulsão de seu cerebro na cobaia 179, a qual, ao cabo de 5 dias, reagiu typicamente, apresentando curva febril durante 4 dias, cahindo em crise e morrendo no 10.° dia após a inoculação. Mostram os graphicos 2 e 3 o decurso desta experiencia, na qual a cobaia inoculada com as larvas apresentou infecção inapparente, como sóe ás vezes acontecer, e a cobaia de passagem 179 teve reacção caracteristica.

Graphico 2

Graphico 3

Das experiencias com larvas de *Amblyomma cajennense* oriundas de femeas alimentadas em cobaias infectadas verificou-se, pois, ser possivel a transmissão hereditaria do virus, não tendo, todavia, sido possivel obter infecção de cobaias pela picada de grande numero de larvas. Deixaremos, todavia, por prudencia, resalvada a hypothese de uma contaminação das larvas por fezes infectadas, caso haja eliminação do virus por esses excreta. Por analogia com outras infecções é, porém, mais certa a infecção hereditaria por nós verificada.

2) Experiencias com *Argas persicus* (Oken).

Com este Argasineo foi feita apenas 1 experiencia, que constou da alimentação de 2 exemplares em cobaia em periodo febril de infecção, seguida de

trituração dos 2 exemplares, 8 dias após sua alimentação e inoculação em cobaia normal, que não teve reacção e não se mostrou immunizada ao ser feita a prova de immunidade, após 40 dias de observação.

A experiencia, foi, portanto, negativa.

3) Experiencias com *Ornithodoros rostratus* Aragão.

Os exemplares de *Ornithodoros rostratus* Aragão empregados nestas experiencias provinham do Estado de Matto Grosso, tendo sido verificado não estarem infectados com espirochetas.

a) Demonstração da receptividade do *Ornithodoros rostratus* Aragão.

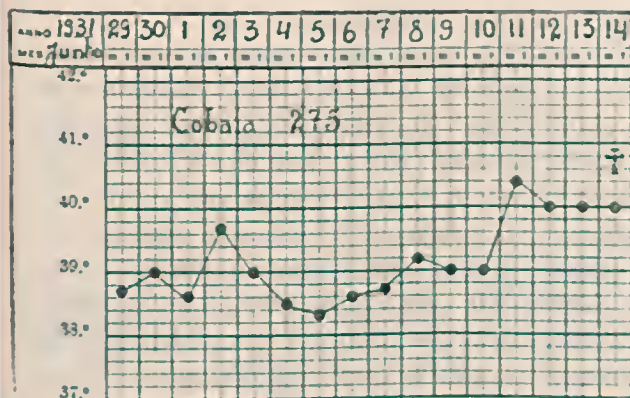
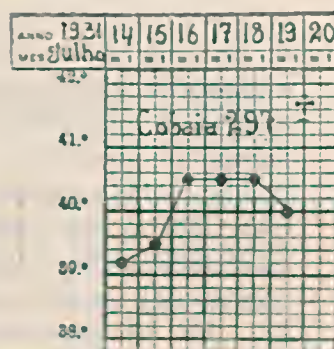
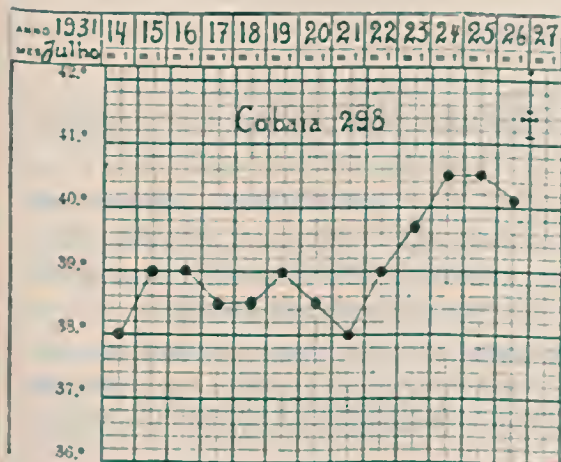
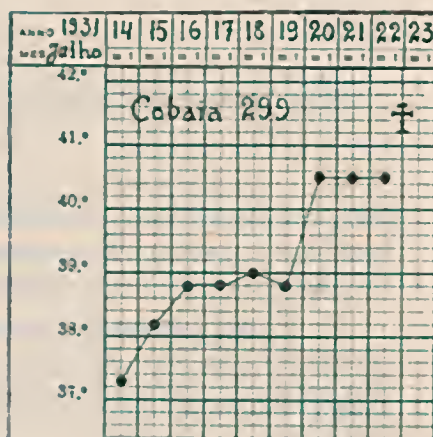
Nas 3 experiencias que foram instituidas, fazendo-se alimentar 3 *Ornithodoros* em cobaias em periodo infectante e inoculando-se 8, 13 e 18 dias após a alimentação, respectivamente, nas cobaias 244, 292, 285 e 287, não foi conseguida infecção, não apresentando as cobaias reacção durante os 20 dias de observação, motivo pelo qual foram inoculadas com virus, prova esta que mostrou não estarem immunizadas. As 3 experiencias foram, portanto, negativas, o que não quer dizer que os *Ornithodoros rostratus* não sejam receptiveis, como o mostraram as experiencias b) e c).

b) Infecção da cobaia pela picada do *Ornithodoros rostratus* infectado.

Foram feitas neste sentido 9 experiencias, só uma das quaes foi positiva, como se verá abaixo, resultado este plenamente demonstrado, pois não só a cobaia picada reagiu typicamente, como o seu sangue e cerebro inoculados em outras cobaias provocaram infecção caracteristica, tendo, alem disso, sido infectante o liquido coxal do carrapato que a sugara, como se verá em d).

O decurso da experiencia foi o seguinte: um exemplar de *Ornithodoros rostratus* foi alimentado na cobaia 244, em pleno periodo febril; 13 dias depois foi posto sobre a cobaia normal 275, alimentando-se abundantemente, pois pesava antes da refeição apenas 0gr.,05 e depois della 0gr.,25. A cobaia 275 apresentou, 13 dias após a picada infectante reacção typica (graphico 4), morrendo 4 dias após em consequencia de uma sangria feita para passagem do virus. Foi necropsiada, sendo inoculadas as cobaias 297, 298 e 299, aquella com sangue e as duas ultimas com emulsão de cerebro da n.º 275, tendo todas ellas reagido typicamente, como se vê pelos graphicos 5, 6 e 7.

Alem desta, foram feitas tentativas de infecção por picada com *Ornithodoros rostratus* que haviam sugado cobaia ou homem doente em numero de dias variavel: 7, 8, 9, 13, 18, 20, 22 e 23 dias utilizando-se para cada experiencia uma nova cobaia, sendo todas submettidas á prova de immunidade. Em todas estas experiencias foi negativo o resultado observado.

Como se deprehende destas experiencias, a infecção do *Ornithodoros rostratus* é possivel após sua alimentação em cobaia infectante, porém não se dá sempre, sendo menor o numero de casos positivos do que o dos negativos.

Graphico 4

Graphico 5

c) Duração do poder infectante do *Ornithodoros rostratus.*

Com o fim de verificar si o poder infectante é duradouro ou si, ao contrario, é passageiro em *Ornithodoros rostratus*, fez-se o mesmo exemplar, que já infectára a cobaia 275 por picada, 13 dias após a refeição infectante, picar, agora 28 dias depois de se ter infectado, a cobaia 301. Esta ultima cobaia, porém, observada durante 1 mês, nenhum symptoma apresentou de infecção; foi então submettida á prova de immunidade, inoculando-se-lhe virus representado pelo triturado do cerebro da cobaia infectada n.° 321, o que determinou apparecimento de reacção typica 3 dias depois.

Por esta experiencia se conclue que, ou bem o poder infectante do *Ornithodoros rostratus* pouco dura, pois um exemplar que, 13 dias depois de infectar-se, transmittia seguramente a infecção, já não mais a transmitte 15 dias depois, ou bem nem todas as picadas de um exemplar infectado são capazes de transmittir o virus.

d) Poder infectante do liquido coxal do *Ornithodoros rostratus.*

Sabido, como é, que o liquido coxal dos carrapatos é muitas vezes infectante, foi neste sentido instituida uma experiencia, da qual resultou demonstrar-se a possibilidade da transmissão do virus por este mechanismo. Foi para isto aproveitado o liquido coxal do mesmo carrapato que já infectára a cobaia 275, liquido este eliminado no momento em que o acariano sugava esta cobaia. O liquido colhido em pipeta foi diluido em solução physiologica e inoculado na cobaia 276, a qual, observada durante 26 dias, não apresentou reacção febril. Submettida, porém, á prova de immunidade, inoculando-se-lhe virus da cobaia infectada 307, mostrou-se immunizada, não tendo reagido a esta ultima inoculação. Isto demonstra que a inoculação do liquido coxal tinha determinado uma infecção benigna, inapparente, seguida de immunidade.

RESUMO

Esta 1.ª parte das pesquisas epidemiologicas pode ser resumida do seguinte modo:

1. O *Amblyomma cajennense* (Fabr.) alimentado em cobaia infectada com typho exanthematico de São Paulo, é susceptivel de adquirir a infecção, transmittindo-a á cobaia, quando triturado e inoculado nesse animal 13 dias depois de infectar-se, não sendo, porém, constante a infecção do Ixodideo.

2. Larvas provenientes de ovos postos por uma femea infectada de *Amblyomma cajennense*, inoculadas em cobaias, provocaram nestas uma infecção inapparente, o que ficou demonstrado pela inoculação do cerebro da primeira cobaia em uma segunda.

3. A unica tentativa de infecção de *Argas persicus* (Oken) foi negativa.

4. E' possivel, embora não sempre, conseguir-se infectar experimentalmente *Ornithodoros rostratus* Aragão, alimentando-o em cobaia em phase infectante.

5. A picada do *Ornithodoros rostratus* é infectante para a cobaia 13 dias após sua infecção.

6. Um *Ornithodoros rostratus*, infectante 13 dias após sua alimentação em cobaia doente, póde não infectar quando sugar 28 dias depois de contaminado.

7. No liquido coxal de *Ornithodoros rostratus* infectado existe o virus com capacidade infectante (immunizante) para a cobaia.

8. O periodo de incubação na infecção experimental da cobaia pela picada do *Ornithodoros rostratus* infectado é mais longo do que o periodo de incubação geralmente observado após injecção do virus na cavidade peritoneal.

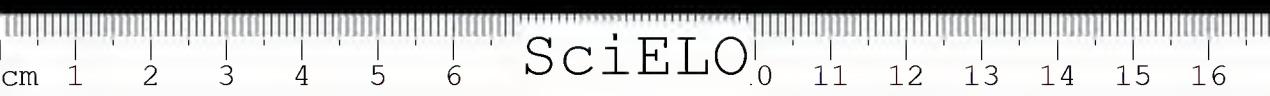
II

Pesquisa do virus em alguns arthropodos sob condições naturaes.

Recentes pesquisas sobre rickettsioses deixaram bem patente que a transmissão dos agentes desse grupo de infecções pode correr por conta de outros arthropodos além do *Pediculus vestimenti*, piolho das roupas e do *Pediculus capitis*, piolho de cabeça, transmissores da *Rickettsia prowazeki* Rocha Lima, 1916, agente do typho classico do Velho Mundo.

Relativamente ao typho exanthematico de S. Paulo, que ha alguns annos vem sendo observado nesta cidade, com pequena disseminação, mas com elevadissimo indice lethal, que orça por mais de 70 %, decidimos emprehender uma serie de pesquisas tendentes a verificar a infecção natural de alguns arthropodos parasitas do homem ou de animaes, domesticos ou não, assumpto este que constitue uma das numerosas incognitas que obscurecem a epidemiologia do nosso "typhus" e que corresponde exactamente aos objectivos deste Instituto, votado como é ao estudo da pathologia humana.

Ao iniciarmos taes verificações, não ignoravamos a serie de difficuldades com as quaes deveriamos contar, peculiares a este genero de pesquisas e oriundas, quer da difficil obtenção do material para estudo, quer do grande numero de animaes sensiveis necessarios á experimentação em larga escala, ou do perigo que apresenta a pesquisa do transmissor de um agente morbigeno dotado da virulencia do causador do typho de São Paulo. De todas as difficuldades, porém, a maior, ao que já previamos, seria a que reside na diluição dos transmissores naturalmente infectados em relação aos individuos não infectados da mesma especie, diluição esta que se deduz dever ser muito elevada, dada a relativa raridade dos casos observados e o seu espaçamento, a menos que se trate de arthropodos que só raramente entrem em contacto com o homem.

Algumas das difficuldades apontadas foram, aliás, contornadas, graças ao apparelhamento do Instituto Butantan para este genero de pesquisas e graças ao auxilio por nós recebido da Secção de Molestias Infectuosas do Serviço Sanitario do Estado, cujo Inspector-chefe, dr. Francisco Salles Gomes e Inspectores, drs. Sampaio Corrêa e Cesar Diogo, bem como o Inspector Geral da capital, dr. Eloy Lessa, são credores do nosso agradecimento, extensivo á turma de captura de ratos chefiada pelo Sr. Jove Gomes e posta á nossa disposição durante algum tempo, a qual nos forneceu material precioso para as pesquisas até agora realizadas.

Resumo das pesquisas effectuadas

Tivemos occasião de pesquisar, nos ultimos meses, pediculideos, pulicideos e cimicideos colhidos, quer sobre os proprios doentes, ou sobre o leito em que estes se encontravam, quer em suas casas, bem como pediculideos, pulicideos, ixodideos e outros acarianos capturados sobre animaes, domesticos ou não, existentes nas habitações onde se tinham verificado casos de typho exanthematico ou em suas vizinhanças, no bairro mais infectado da cidade, limitrophe com a zona rural.

Os trabalhos mais recentes sobre a transmissão de rickettsioses outras que não o typho exanthematico classico do Velho Mundo, accusam varios arthropodos da transmissão dessas infecções: as pulgas dos ratos no caso do typho endemico norte-americano e o *Rhipicephalus sanguineus*, carrapato do cão, no caso da febre botonosa de Tunis e da febre exanthematica de Marselha; alem desses, o acariano *Dermanyssidae*, *Liponyssus bacoti* (Hirst, 1913), tem sido incriminado de transmittir o "typhus" dos Estados Unidos e a molestia de Brill do Mediterraneo. Está demonstrado, alem disso, ha mais tempo, que a rickettsiose conhecida por febre das Montanhas Rochosas é transmittida pelos carrapatos *Dermacentor andersoni* e *Dermacentor variabilis* e que o "tsutsugamushi" japonês, outra infecção pertencente ao mesmo grupo, tem sua disseminação assegurada pelas larvas do acariano *Trombicula akamushi*.

Vejamos, em rapido golpe de vista, quaes desses arthropodos occorrem na zona mais infectada da cidade, isto é, zona suburbana e rural.

Em nossas investigações, observámos que justamente no bairro mais infectado de São Paulo as pulgas de ratos são de extrema raridade, embora abundem em outros bairros, apenas tendo sido capturados, na zona de Pinheiros e limitrophes, 1 *Xenopsylla cheopis* e 22 *Craneopsylla minerva* em 128 ratos desta zona pesquisados, ao passo que a colheita de pulgas em ratos da zona mais central da cidade, onde tem sido muito mais raro o "typhus", foi sempre abundante.

Só raramente foi capturado *Rhipicephalus sanguineus* sobre cães nas casas dos doentes e os exemplares pesquisados, bem como outras especies de ixodideos examinados, não se achavam infectados.

Entre os acarianos encontrámos com grande frequencia parasitando ratos: *Echinolaelaps echidninus* (Berlese, 1887) e *Laelaps nuttalli* Hirst, 1915, e só muito raramente *Liponyssus bacoti* (Hirst, 1913).

Ao contrario disso, porém, foi *Liponyssus bacoti* encontrado com grande frequencia e abundancia sobre o preá (*Cavia aperea*), cavideo muito commum nos arredores de São Paulo, tendo sido verificada 6 vezes a sua presença em 9 preás capturados na zona infectada, chegando a ser observada a existencia de cerca de 500 exemplares sobre um mesmo preá. Além disso, foi *Liponyssus*

bacoti capturado uma vez parasitando uma creança em casa donde acabava de sahir doente de typho exanthematico.

Alem das pesquisas com ecto-parasitas capturados na zona suburbana ou mesmo rural, estão em andamento outras, com pulicideos capturados sobre ratos de zona urbana, da rua Florida, onde occorrera um caso de "typhus", tendo sido identificadas as seguintes especies de pulgas: *Xenopsylla cheopis, Xenopsylla brasiliensis, Ctenopsyllus musculi, Ceratophyllus fasciatus* e *Ctenocephalides felis.*

Durante as pesquisas até agora realizadas foram examinados os seguintes arthropodos, os quaes, depois de triturados em gral com solução physiologica, eram injectados na cavidade peritoneal de cobaias:

1.ª Serie (da zona suburbana e rural):

26 *Pulex irritans* colhidos em roupas de camas de onde acabavam de sahir doentes com typho exanthematico; inoculados em 3 cobaias.

97 *Ctenocephalides felis* capturados sobre cães e gatos de casas de doentes; inoculados em 4 cobaias.

16 *Craneopsylla minerva* capturados sobre ratos; inoculados em 1 cobaia.

6 *Pediculus capitis* colhidos sobre 2 doentes de typho exanthematico na ultima phase da molestia; inoculados em 1 cobaia.

20 *Pediculus capitis* colhidos sobre creanças de casas de doentes; inoculados em 1 cobaia.

10 *Linognathus piliferus*, piolhos de cão, capturados sobre cães de casa de doente.

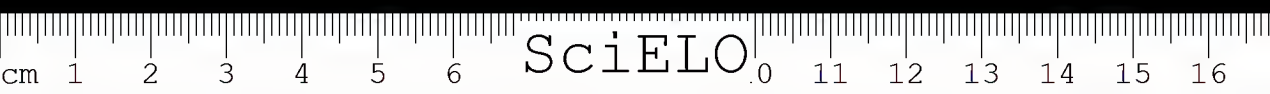
120 *Cimex lectularius* colhidos, quer no proprio leito dos doentes, quer em camas de outros habitantes da casa infectada, tendo sido feita a inoculação, não só do triturado, como tambem de fezes, submettendo-se, alem disso, cobaias á picada dos hemipteros, experiencias estas praticadas em 7 cobaias.

350 larvas de *Boophilus microplus* colhidos na vegetação da zona infectada; inoculadas em 2 cobaias.

4 *Rhipicephalus sanguineus* colhidos em cães de um dos doentes; inoculados em 1 cobaia.

13 *Amblyomma ovale* de igual procedencia; inoculados em 2 cobaias.

100 *Liponyssus bacoti* capturados sobre 5 preás da zona infectada; inoculados em 2 cobaias.

600 *Echinolaelaps echidninus* e *Laelaps nuttalli* capturados sobre ratos da zona infectada; inoculados ou obrigados a picar cobaias, utilizando-se 9 cobaias.

4 *Liponyssus bursa*, capturados sobre gallinhas de casas de doentes de typho exanthematico; inoculados em 1 cobaia.

2.ª Serie (zona urbana):

75 *Ctenopsyllus musculi;* inoculados em 4 cobaias.
69 *Xenopsylla cheopis;* inoculados em 4 cobaias.
2 *Xenopsylla brasiliensis;* inoculados em 1 cobaia.
1 *Ceratophyllus fasciatus;* inoculado em 1 cobaia.
1 *Ctenocephalides felis;* inoculado em 1 cobaia.

As cobaias utilizadas para essas experiencias foram todas submettidas a observação rigorosa, traçando-se a curva de temperatura durante um prazo minimo de 20 a 30 dias, findos os quaes eram submettidas á prova de immunidade Sempre que havia reacção febril a cobaia era sangrada no coração e o sangue inoculado em outra, para passagem do virus, afim de verificar si teria sido esta a causa da reacção.

Para a prova de immunidade inoculava-se, por via peritoneal, virus de passagem, isolado de doente proveniente da zona rural, virus já descripto por um dos auctores em trabalhos anteriores e representado por emulsão de cerebro de cobaia infectada, em dose seguramente infectante, havendo sempre testemunhas das inoculações.

Resultados:

Pelas experiencias realizadas, tomando, como criterio de verificação positiva, reacção febril de mais de um grão centigrado acima da media individual da cobaia ou a immunidade apresentada contra a infecção por dose de virus cerca de 1000 vezes superior á dose minima infectante, verificámos que nenhuma das cobaias inoculadas, com pediculideos, pulicideos, cimicideos, ixodideos ou acarianos, se apresentou infectada, pois nem uma só das 37 cobaias utilizadas apresentou reacção febril typica e todas as já submettidas á prova de immunidade reagiram fortemente, demonstrando não terem ficado immunizadas após a inoculação com aquelles arthropodos.

Discussão

Maxcy, em 1929 (6), estudando o "typhus" do sul dos Estados Unidos, julga que o virus não é transmittido pelo *Pediculus humanus,* acreditando, baseado em considerações de ordem epidemiologica, que a transmissão deve correr por conta de arachnideos (carrapatos ou outros acarianos), aventando a hypothese de serem roedores os depositarios do virus.

Mooser e Dummer, em 1930 (5), estabeleceram a possibilidade da infecção experimental do piolho do homem com o virus do typho dos estados do Atlantico Sul (America do Norte).

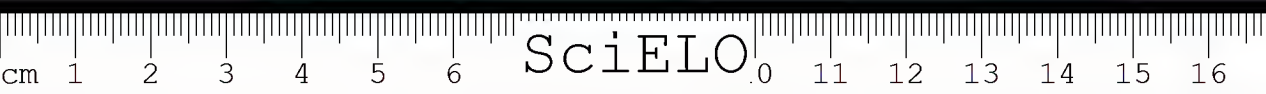
Castaneda e Zinsser, em 1930 (7), infectaram experimentalmente percevejos (por via rectal, pelo methodo de Weigl), os quaes, injectados em cobaias, a estas conferiam infecções typicas. Os resultados de tentativas de infecção de cobaias pela picada ou pelas fezes dos percevejos foram, entretanto, negativas. Conseguiram ainda os mesmos pesquisadores infectar piolhos utilizando a mesma technica, verificando que os pediculideos inoculados em cobaias determinavam infecção.

Durand e Conseil (8), em 1931, provaram ser o *Rhipicephalus sanguineus*, carrapato do cão, o responsavel pela transmissão da febre marselhesa ou botonosa de Tunis.

Em 1931, Dyer e Badger (9) deram, pela primeira vez, a prova de que existe, naturalmente infectado, um outro insecto que não o *Pediculus humanus*, capaz de transmittir o "typhus" do Novo Mundo. Conseguiram estes pesquisadores capturar, em Baltimore, pulgas do rato, que trituradas e inoculadas em cobaias conferiram a estas infecção typica, apresentando-se as cobaias, restabelecidas da infecção, immunes a nova infecção provocada pela raça norte-americana do virus. A verificação de Dyer e Badger constitue uma contribuição da mais alta relevancia para a elucidação dos problemas epidemiologicos relacionados com a forma norte-americana do typho exanthematico, representando uma prova decisiva de sua distincção do typho classico da Europa.

Complemento de grande valor da verificação de Dyer e Badger é a prova que acabam de dar Mooser, Castaneda e Zinsser (10), de que a propagação do "typhus" americano do norte entre os ratos, seus depositarios naturaes, é devida ao piolho *Polyplax spinulosa*, parasita do rato dos esgotos, ficando desse modo fechado o cyclo da modalidade norte-americana da infecção, o que não quer, todavia, dizer que não venha a ser demonstrada a possibilidade da existencia de outros vectores.

Está, além disso, bem estabelecido por pesquisas mais antigas que a rickettsiose conhecida por febre das Montanhas Rochosas é transmittida pelo *Dermacentor andersoni* e pelo *Dermacentor modestus*, encontrados naturalmente infectados, respectivamente, por Ricketts e por Maver. Sabe-se tambem, ha muito, serem *Trombicula akamushi* e *Trombicula deliensis*, respectivamente, os transmissores do "tsutsugamushi" japonês e do "pseudo-typhus" das Indias Hollandesas.

Em relação ao typho de S. Paulo, assignalámos no capitulo anterior, que, experimentalmente, é possivel a transmissão do virus por intermedio do *Amblyomma cajennense* e *Ornithodoros rostratus*.

Em condições naturaes, porém, não pudemos, até agora, chegar a uma conclusão definitiva em relação á existencia do virus em uma grande serie de arthropodos examinados.

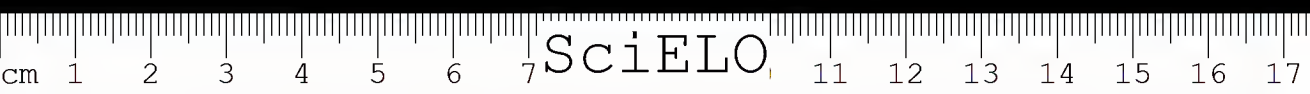
Estes resultados, entretanto, permittem concluir que, para a transmissão natural do typho exanthematico de S. Paulo, é muito pequena a probabilidade de ser este papel desempenhado por *Pediculus capitis*, *Pulex irritans* ou *Cimex lectularius*, que são os ectoparasitas que apresentam relações mais immeditas com o homem, entre nós. Estes insectos foram capturados em flagrante parasitismo dos doentes, quer sobre elles proprios, quer nos seus leitos, ou sobre pessoas ou leitos de casas onde acabavam de ser assignalados novos casos, havendo, portanto, toda a probabilidade de que se achassem infectados, caso fossem susceptiveis á infecção, o que não se verificou.

Necessario, porém, se faz resalvar a hypothese de exigirem elles um prazo de incubação maior, para transmittirem a infecção, do que o que lhes foi concedido. Os exemplares examinados foram em regra colhidos, em media, cerca de uma semana após o inicio da infecção dos doentes, sendo inoculados no mesmo dia ou no dia seguinte ao da captura. Sabendo-se que em condições naturaes esses parasitas se alimentam com frequencia, a probabilidade é de que o virus já tivesse tido tempo de soffrer multiplicação sufficiente para que o insecto se tornasse infectante, caso fosse receptivel.

E' sabido, como o assignalou Rocha Lima (11), que os piolhos alimentados em doentes de typho exanthermatico europeu exigem prazo de 4 a 5 dias para se tornar infectantes, falhando, porém, ás vezes essa regra e só vindo a apresentar infecção demonstravel depois de 8 dias. Não é impossivel que, no caso do typho de S. Paulo, o prazo habitual de incubação seja mas longo do que o exigido para o "typhus" do Velho Mundo, nisso residindo a razão de não ter sido obtida a infecção, quer com os piolhos, quer com as pulgas e os percevejos examinados.

Não é, alem disso, conhecido o gráo de receptividade que porventura possam apresentar no caso do typho de S. Paulo, não sendo impossivel, embora seja menos provavel, que só um numero muito pequeno de exemplares se torne infectante, o que se verifica em menor escala, aliás, com o typho exanthematico classico, em que nem todos os piolhos se infectam ao sugar o doente em phase infectante. Nesse caso só o exame de um numero muito maior de exemplares capturados sobre doentes poderia conduzir a resultado definitivo.

São estas, porém, meras hypotheses, que aventamos apenas para deixar bem patente não considerarmos definitivos os resultados a que até agora chegámos.

Fomos levados, no decurso das pesquisas, a algumas conclusões de interesse, baseados no estudo da fauna de ectoparasitas dos roedores examinados.

Notavel contraste foi observado relativamente ao indice pulicideano dos ratos capturados nas zonas suburbanas ou mesmo rural e na zona propriamente urbana da cidade. Nos ratos daquellas zonas (suburbana e rural) foi inteiramente excepcional o encontro de publicideos (1 *Xenopsylla cheopis* e 22 *Craneopsylla minerva* em 128 ratos), os quaes, entretanto, parasitam abundantemente os ratos da zona urbana (*).

Occorrendo o maior numero de casos de "typhus" justamente nas zonas suburbana e rural, onde se reveste de particular gravidade, zonas estas nas quaes quasi não são encontradas pulgas parasitando ratos, somos forçados a concluir que é pequena a probabilidade de serem as pulgas dos ratos os transmissores habituaes do "typhus" observado nessas zonas. Existindo, entretanto, as pulgas em abundancia nos ratos da zona urbana, onde o typho tambem occorre, si bem que mais raramente e talvez sob forma mais benigna, torna-se acceitavel a hypothese de representarem o papel de transmissores da infecção na zona urbana.

Por outro lado, segundo tivemos opportunidade de verificar (12), existe nas zonas suburbana e rural de S. Paulo um pequeno cavideo, o preá, *Cavia aperea*, frequente e intensamente parasitado por *Liponyssus bacoti*, acariano parasita tambem do rato e do homem. Este acariano vem sendo incriminado com insistencia de transmittir ao homem o typho norte-americano, tendo ficado provado, em novembro do anno findo, por Dove e Shelmire (13), que, experimentalmente, elle pode ser infectado ao alimentar-se sobre um animal doente, transmittindo então a infecção pela picada.

Diante desses dados é perfeitamente licito perguntar si em São Paulo não será o typho da zona urbana, onde abundam as pulgas dos ratos, transmittido ao homem por estes syphonopteros, tal como succede na America do Norte, segundo o provaram Dyer e Badger (9) e si o typho das zonas suburbana e rural, onde as pulgas de ratos são extremamente raras, não terá como transmissor o *Liponyssus bacoti* (como o querem Dove e Shelmire) ou algum outro acariano, como, p. ex., as larvas de carrapatos, que verificámos serem sensiveis ao "typhus" experimental.

Succederia nesta hypothese com o typho exanthematico de S. Paulo o mesmo que já está verificado para o typho tropical dos Estados Malaios, onde occorre uma forma urbana e uma rural da infecção.

Tal hypothese, porém, somente poderá ser defendida após um estudo sorologico das duas possiveis formas da infecção, bem como após verificações acuradas do comportamento experimental dos respectivos virus.

(*) As designações de urbana, sub-urbana e rural por nós empregadas não devem ser interpretadas como correspondentes ás divisões administrativas da cidade e do Estado, significando apenas o grao de densidade de habitações e o aspecto da zona em questão, factores de importancia no estudo que emprehendemos.

RESUMO

1. Tendo inoculado, em cobaias, exemplares de *Pediculus capitis, Pulex irritans* e *Cimex lectularius,* colhidos sobre doentes ou pessoas da casa e nas camas dos mesmos, acreditam os auctores ser muito pouco provavel que estes hematophagos desempenhem o papel de transmissores habituaes do typho exanthematico de S. Paulo.

2. Foram negativas as experiencias tendentes a demonstrar a presença do virus, em condições naturaes, nos seguintes arthropodos, capturados em liberdade ou em parasitismo em ratos, cães, gatos e gallinaceos das zonas infectadas:

Pulicideos: *Xenopsylla cheopis, Xenopsylla brasiliensis, Ctenopsyllus musculi, Ceratophyllus fasciatus* e *Craneopsylla minerva,* capturados sobre rato e *Ctenocephalides felis* capturados sobre cão, gato e rato.

Pediculideos: *Linognathus piliferus,* piolho do cão.

Ixodideos: *Amblyomma ovale* e *Rhipicephalus sanguineus,* carrapatos do cão e *Boophilus microplus,* carrapato do boi, este em phase de larva e capturado quando em liberdade.

Acarianos *Dermanyssidae*: *Echinolaelaps echidninus, Laelaps nuttalli* e *Liponyssus bacoti* capturados sobre ratos e o ultimo tambem sobre preás; *Liponyssus bursa* capturado sobre gallinaceos.

3. O estudo da fauna de ectoparasitas das zonas da cidade onde occorre a infecção, a suburbana ou rural e a urbana, alliado a razões de ordem epidemiologica e de comportamento experimental do virus, parece indicar que o transmissor habitual do virus deve ser a pulga dos ratos na zona urbana e um acariano, *Dermanyssidae* (*Liponyssus bacoti*) ou *Ixodidae,* na zona suburbana ou rural, facto que, sendo verdadeiro, coincidirá com uma possivel diversidade do virus nas duas zonas, tornando-se necessarias outras pesquisas para que se confirme a hypothese.

III

Os ratos como possiveis depositarios do virus.

A existencia de outros depositarios de "virus", alem do proprio homem, na natureza é facto hoje acceito em relação a varias "rickettsioses". Para a febre maculosa das Montanhas Rochosas são incriminados varios roedores silvestres, principalmente coelhos selvagens; no caso do "tsutsugamushi", do Japão, o roe-

dor *Microtus montebelloi* e outros; quanto ao typho endemico da America do Norte (Estados Unidos e Mexico) os estudos recentes (1931) de Mooser, Castaneta e Zinsser (14), no Mexico, provaram ser os ratos depositarios do virus, graças á inoculação de emulsão de cerebro destes animaes em cobaias e confirmando, deste modo, as verificações de Dyer e Badger (15) quanto á fonte natural de infecção das pulgas, incriminadas por estes como transmissores do virus ao homem.

A transmissibilidade por intermedio das pulgas dos ratos foi confirmada por Mooser, Zinsser e Castaneda, nos Estados Unidos e, logo depois, por Kemp (16).

A infecção de rato a rato é entretida não só por meio das pulgas, mas principalmente, segundo Mooser, Castaneda e Zinsser (10), por meio do piolho do rato, o *Polyplax spinulosa.*

Estudando o typho exanthematico de S. Paulo sob varios dos seus aspectos, não podiamos deixar de emprehender a pesquisa de possiveis depositarios naturaes do seu virus. Nossos estudos neste sentido foram iniciados antes de termos tomado conhecimento dos recentes trabalhos dos auctores americanos, e se justificavam em virtude do aspecto epidemiologico da propria infecção.

Nos capitulos anteriores foram relatados os resultados da transmissão experimental do virus por meio de Ixodideos e os das pesquisas feitas para a verificação de infecção natural em arthropodos diversos: Pulicideos, Pediculideos, Cimicideos, Ixodideos e outros acarianos.

Mostraremos, agora, os resultados obtidos para a verificação da possibilidade de serem os ratos depositarios naturaes do virus do typho de S. Paulo.

Technica empregada

Ratos capturados na zona infectada da cidade e enviados vivos ao Instituto pela Secção de Prophylaxia de Molestias Infectuosas do Serviço Sanitario do Estado eram immediatamente examinados. Com os cuidados technicos necessarios, eram colhidos os ectoparasitas porventura existentes, separados de accordo com a especie, para estudo estatistico da frequencia com que eram verificados, sacrificando-se e necropsiando-se em seguida os hospedeiros. Durante a necropsia era colhido material, inclusive de hematozoarios e Leptospiras, visando o conhecimento dos parasitas dos ratos da zona correspondente. Nos exemplares que apresentavam alguma lesão evidente macroscopica, eram colhidos fragmentos de organs diversos para estudo histo-pathologico. O cerebro de todos os ratos era retirado asepticamente e collocado em placas de Petri esterilizadas. Em seguida era feita emulsão, em agua physiologica, do cerebro, sendo esta immeditamente inoculada em cobaia por via peritoneal. Para economia de ani-

N.º dos ratos	N.º da cobaia inoculada	Data	Resultado da inoculação	PROVA DE IMMUNIDADE			OBSERVAÇÕES	Resultado da pesquisa
				Data	Virus inoculado	Resultado		
1 e 2	362	8-IX-31	Não apresentou reacção febril.	7-X-31	Em. cer. cob. 420	Incubação de 4 dias; reacção febril durante 4 dias; morte na manhã de 7-X-31.	Epimys norvegicus	Negativo
3	363	8-IX-31	Incubação de 2 dias; reacção febril durante 2 dias (40°0; 40°0). Amanheceu morta a 13-IX-31.	—	—	—	Mus sp.. A cobaia 363 foi sangrada no 2.º dia de reacção, retirando-se 0cc. 5 de sangue, que foram inoculados na cob. 380. Após 8 dias apresentou esta reacção por 2 dias (40°0 e 39°8) resistindo á infecção. A prova de immunidade da cob. 380 não poude ser completa, mas o animal morreu 3 dias após a inoculação do virus. O cerebro da cob. 363 inoculado na cob. 382 não provocou reacção. A prova de immunidade feita a 7-X-31 na cob. 382 demonstrou não estar esta immunizada, tendo apresentado reacção febril de 12 a 18-X-31, morrendo de 19 para 20-X-31.	Negativo
4	369	9-IX-31	Não apresentou reacção.	7-X-31	Em. cer. cob. 420	Incubação de 2 dias; reacção febril por 6 dias. Amanheceu morta a 17-X-31.	Epimys norvegicus	Negativo

5	370	9-IX-31	Não apresentou reacção.	7-X-31	Em. cer. cob. 420	Incubação de 4 dias; reacção febril de 3 dias; morte de 14 para 15-X-31.	**Epimys norvegicus**	Negativo
6	372	10-IX-31	Incubação de 5 dias; reacção febril ligeira (39°6; 39°7; 39°3) por 3 dias. Amanheceu morta a 20-IX-31.	—	—	—	**Epimys norvegicus** O cer. da cob. 372 foi inocul. na cob. 398, que teve reacção ligeira 7 dias após a inoculação (39°5; 39°3). Feita a prova de immunidade a 22-X-31, apresentou ligeira reacção, com maximo de 39°7, morrendo na manhã de 30-XI-31.	Negativo
7	376	11-IX-31	Não apresentou reacção febril.	7-X-31	Em. cer. cob. 420	Incubação de 2 dias; reacção febril por 5 dias; amanheceu morta 15-X-31	**Epimys norvegicus.**	Negativo
8 e 9	377	11-IX-31	Não apresentou reacção febril.	7-X-31	Em. cer. cob. 420	Immunizada. Não apresentou reacção febril até 22-XII-31.	**Epimys norvegicus**	Positivo
10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16	378	11-IX-31	Não apresentou reacção febril.	7-X-31	Em. cer. cob. 420	Incubação de 3 dias; reacção febril por 6 dias; amanheceu morta a 20-X-31.	sp.?	Negativo
17	381	12-IX-31	Não apresentou reacção febril.	7-X-31	Em. cer. cob. 420	Incubação de 5 dias; reacção febril por 4 dias; sobrevivencia.	**Mus sp.**	Negativo
18	383	13-IX-31	Não apresentou reacção febril. Amanheceu morta a 22-IX-31.	—	—	—	**Epimys norvegicus** **Causa mortis: toxoplasmose verificada por necropsia.**	—

N.º dos ratos	N.º da cobaia inoculada	Data	Resultado da inoculação	PROVA DE IMMUNIDADE			OBSERVAÇÕES	Resultado da pesquisa
				Data	Virus inoculado	Resultado		
19, 20 e 21	392	17-IX-31	Não apresentou reacção febril.	22-X-31	Em. cer. cob. 451 e 455.	Incubação de 3 dias; reacção febril durante 3 dias. Amanheceu morta a 30-X-31.	*Mus* sp.	Negativo
22 e 23	395	19-IX-31	Não apresentou reacção febril.	22-X-31	Em. cer. cob. 451 e 455.	Incubação de 3 dias; reacção febril de 7 dias; morta a 2-XI-31.	*Mus* sp.	Negativo
24	397	19-IX-31	Não apresentou reacção febril.	22-X-31	Em. cer. cob. 451 e 455.	Incubação de 4 dias; reacção febril de 4 dias; morta a 30-X-31.	*Mus* sp.	Negativo
25	399	21-IX-31	Não apresentou reacção febril.	22-X-31	Em. cer. cob. 451 e 455.	Incubação de 3 dias; reacção febril de 4 dias; morta a 31-X-31.	*Mus* sp.	Negativo
26	400	22-IX-31	Não apresentou reacção febril.	22-X-31	Em. cer. cob. 451 e 455.	Incubação de 3 dias; reacção febril de 6 dias; amanheceu morta a 2-XI-31.	*Epimys norvegicus*	Negativo
27	411	26-IX-31	Morta a 29-IX-31 (peritonite).	—	—	—	*Mus* sp.	—
28	412	28-IX-31	Não apresentou reacção febril	22-X-31	Em. cer. cob. 451 e 455.	Morta de 26 para 27-X-31.	*Mus* sp. Causa mortis: peritonite.	—
29, 30 e 31	413	29-IX-31	Incubação de 6 dias; ligeira reacção febril durante 5 dias (40°0; 38°8; 40°0; 39°7).	22-X-31	Em. cer. cob. 451 e 455.	Morta de 22 para 23-X-31.	*Epimys norvegicus* Causa mortis: peritonite.	Negativo

32, 33, 34 e 35	414	29-IX-31	Morta a 5-X-31	—	—	—	Mus sp.	—
36	415	29-IX-31	Não apresentou reacção febril. Morta a 18-X-31	—	—	—	Mus sp.	—
37 (*)	427	30-IX-31	Não apresentou reacção febril.	22-X-31	Em. cer. cob. 451 e 455.	Incubação de 3 dias; reacção febril de 5 dias; amanheceu morta a 1-XI-31.	**Epimys norvegicus** da zona não infectada.	Negativo
38, 39 e 40	421	2-X-31	Não apresentou reacção febril.	22-X-31	Em. cer. cob. 451 e 455.	Incubação de 4 dias; reacção febril de 2 dias; morta a 29-X-31.	**Epimys norvegicus**	Negativo
41 e 42	422	2-X-31	Não apresentou reacção febril. Morta de 14 para 15-X-31.	—	—	—	**Mus sp.** Veja observação cob. 425.	Negativo
43 e 44	423	2-X-31	Não apresentou reacção febril.	22-X-31	Em. cer. cob. 420 e 455.	Morta de 22 para 23-X-31.	**Epimys norvegicus**	Negativo
45, 46 e 47	424	2-X-31	Não apresentou reacção febril. Morta de 14 para 15-X-31.	—	—	—	**Mus sp.** Veja observação cob. 425.	Negativo
48, 49, 50, 51, 52 e 53	425	5-X-31	Não apresentou reacção febril. Morta a 15-X-31.	—	—	—	**Mus sp.** A emulsão do cer. das cobaias 422, 424 e 425, inocul. a 15-X-31 na cob. 450, não provocou reacção febril, não se tendo esta cob. mostrado immunizada ao ser inoculada a 5-XI-31 com virus, tendo, após incubação de 5 dias apresentado reacção febril por 4 dias, morrendo a 15-XI-31.	Negativo

N.º dos ratos	N.º da cobaia inoculada	Data	Resultado da inoculação	PROVA DE IMMUNIDADE			OBSERVAÇÕES	Resultado da pesquisa
				Data	Virus inoculado	Resultado		
51 a 63	426	6-X-31	Após 7 dias apresentou reacção por 3 dias (40°0; 40°0; 39°6)	22-X-31	Em. cer. cob. 451 e 455.	Após 2 dias de incubação apresentou 2 de reacção (39°8, 40°0). Amanheceu morta a 29-X-31.	Epimys norvegicus	Duvidoso
64, 65 e 66	428	6-X-31	Não apresentou reacção febril.	22-X-31	Em. cer. cob. 451 e 455.	Após 4 dias de incubação teve 6 dias de reacção febril, morrendo de 2 para 3-XI-31.	Epimys norvegicus	Negativo
67, 68 e 69	431	7-X-31	Não apresentou reacção febril. Morta a 21-X-31.	—	—	—	1 Mus sp. e 2 Epimys norvegicus. O cer. da 431 foi inoculado na 459 a 21-X-31. Não apresentando reac. febril foi a 459 inocul. com virus, reagindo febrilmente durante 6 dias após 3 dias de incubação. Morte a 8-XII-31.	Negativo
70 a 79	439	8-X-31	Não apresentou reacção febril. Morta de 21 para 22-X-31.	—	—	—	Epimys norvegicus jovens. A emulsão do cer. cob. 439 inoculada na cob. 463 a 22-X-31, provocou nesta após 4 dias de incubação reac. febril pouco typica (39°5; 40°0; 39°0; 39°3; 39°8). Amanheceu morta a 1-XI-31.	Duvidoso
80	440	8-X-31	Não apresentou reacção febril.	28-X-31	Em. cer. cob. 451	Morta a 3-XI-31.	Epimys norvegicus	Negativo

81, 82, 83 e 84	441	10-X-31	Não apresentou reacção febril. Morta de 19 para 20-X-31.	—	—	—	**Epimys norvegicus** O cer. da 441 foi inoculado a 20-X-31 na cob. 458, que a 13-XI-31 foi submettida á prova de immunidade, reagindo com febre após 3 dias de incubação, durando a reacção 5 dias. Morreu a 23-XI-31.	Negativo
85 e 86	445	12-X-31	Não apresentou reacção febril. Morta de 17 para 18-X-31.	—	—	—	**Epimys rattus**	Negativo
87, 88 e 89	456	19-X-31	Não apresentou reacção febril.	13-XI-31	Em. cer. cob. 499	Após 3 dias de incubação apresentou reacção por 3 dias, morrendo de 20 para 21-XI-31.	**Mus sp.**	Negativo
90, 91 92 e 93	461	21-X-31	Não apresentou reacção febril.	13-XI-31	Em. cer. cob. 499	Após 3 dias de incubação teve reacção febril por 3 dias, morrendo a 21-XI-31.	**Epimys norvegicus**	Negativo
94, 95, 96 e 97	462	21-X-31	Não apresentou reacção febril. Morta de 12 para 13-XI-31.	—	—	—	**Epimys norvegicus**	Negativo
98, 99 e 100	469	22-X-31	Não apresentou reacção febril.	13-XI-31	Em. cer. cob. 499	Não apresentou reacção febril. Viva a 23-XII-31.	**Epimys norvegicus** A cobaia mostrou-se immunizada.	Positivo
101, 102 e 103	472	26-X-31	Não apresentou reacção febril.	13-XI-31	Em. cer. cob. 499	Após 3 dias de incubação reagiu com febre de 17 a 23-XI-31, morrendo a 30-XI-31.	**Epimys norvegicus**	Negativo

N.º dos ratos	N.º da cobaia inoculada	Data	Resultado da inoculação	PROVA DE IMMUNIDADE			OBSERVAÇÕES	Resultado da pesquisa
				Data	Virus inoculado	Resultado		
101, 105 e 106	173	27-X-31	Não apresentou reacção febril. Morta a 13-XI-31.	—	—	—	*Epimys norvegicus*	Negativo
107, 108 e 109	474	28-X-31	Não apresentou reacção febril.	21-XI-31	Em. cer. cob. 508	Após 5 dias de incubação teve reacção febril de 3 dias, amanhecendo morta a 7-XII-31.	*Epimys norvegicus*	Negativo
110 e 111	476	30-X-31	Não apresentou reacção febril.	21-XI-31	Em. cer. cob. 508	Após 3 dias de incubação teve reacção febril de 4 dias, morrendo de 2 para 3-XII-31.	*Mus* sp.	Negativo
112 e 113	480	31-X-31	Não apresentou reacção febril. Morta a 8-XI-31.	—	—	—	*Mus* sp. e *Epimys norvegicus*. Causa mortis: peritonite.	—
114 e 115	482	3-XI-31	Não apresentou reacção febril.	21-XI-31	Em. cer. cob. 508	Após 2 dias de incubação apresentou reacção febril por 8 dias, morrendo a 3-XII-31.	*Epimys norvegicus*	Negativo
116 e 117	483	1-XI-31	Não apresentou reacção febril.	21-XI-31	Em. cer. cob. 508	Após 3 dias de incubação teve 4 dias de reacção febril, morrendo a 3-XII-31.	*Mus* sp. e *Mus musculus*	Negativo
118, 119 e 120	487	5-XI-31	Não apresentou reacção febril. Morta de 12 para 13-XII-31.	—	—	—	*Epimys norvegicus* Causa mortis: Toxoplasmose	—

121 e 122	498	6-XI-31	Não apresentou reacção febril. Morta de 16 para 17-XII-31.	—	—	—	*Epimys norvegicus* e *Epimys rattus*	Negativo
123 e 124	501	5-XI-31	Não apresentou reacção febril.	2-XII-31	Em. cer. cob. 521	Após 4 dias de incubação, elevação thermica por 7 dias, tendo sobrevivido.	*Epimys norvegicus*	Negativo
125, 126, 127 e 128	507	11-XI-31	Após 4 dias apresentou reacção febril por 3 dias (40°0; 39°5; 40°0), morrendo a 23-XI-31.	—	—	—	*Epimys norvegicus* O sangue da cob. 507 foi inoculado a 21-XII-31 na cob. 519, que não teve reac. febril, morrendo a 4-XII-31, apres. toxoplasmose. O cer. da cob. 507 foi inocul. a 23-XI-31 na cob. 520, que apres. reac. febril durante 3 dias (39°9; 39°5; 40°0), sendo sacrificada a 2-XII-31, sendo tambem encontrada toxoplasmose, inoculando-se o cer. na cob. 533, que morreu a 1-XII-31 com paralys. dos membros.	Duvidoso
129, 130 e 131 (*)	528	28-XI-31	Não apresentou reacção febril.	16-XII-31	Em. cer. cob. 536	Após 4 dias de incubação teve reacção por 4 dias e morte na noite de 25 para 26-XII-31.	sp.?	Negativo

N.º dos ratos	N.º da cobaia inoculada	Data	Resultado da inoculação	PROVA DE IMMUNIDADE			OBSERVAÇÕES	Resultado da pesquisa
				Data	Virus inoculado	Resultado		
132 e 133 (*)	529	30-XI-31	Após 8 dias de incubação teve ligeira reacção febril (39º3) por 5 dias.	4-I-32	Em. cer. cob. 561	Apresentou reacção typica, não se mostrando, pois, immunizada em relação ao virus do typho exanth. de S. Paulo (virus rural).	**Epimys norvegicus** A cob. 529 foi sangrada a 12-XII-31, sendo inocul. com o sangue a cob. 541, que apres. após 13 dias, reac. febril durante 5 dias. Foi feita passagem deste virus (virus murino A) para a cob. 559 que teve, após 5 dias, reac. febril durante 5 dias, sendo sacrificada e feitas novas passagens.	Positivo para o virus murino
134 e 135 (*)	530	1-XII-31	Não apresentou reacção febril.	29-XII-31	Em. cer. cob. 556	Morreu na noite de 4 para 5-I-32.	**Epimys rattus** e **Epimys norvegicus**	Negativo
136 e 137 (*)	535	7-XII-31	—	-	—	—	**Epimys norvegicus** Morta na noite de 11 para 12-XII-31. Peritonite.	—
138 e 139 (*)	539	11-XII-31	Reacção febril durante 8 dias após incubação de 12 dias.	-	-	-	**Epimys norvegicus** e **Epimys rattus** Em 28-XII-31 foi sangrada e inocul. a cob. 558, sendo conseguida, após esta, novas passagens do virus murino (B).	Positivo para o virus murino
154 a 161 (*)	552	21-XII-31	Não apresentou reacção febril.	—	—	-	**Epimys norvegicus** e **Epimys rattus** Morta accidentalmente em 18-I-32.	Negativo

(*) Ratos provenientes da zona urbana da cidade.

maes reactivos, era geralmente inoculada a emulsão de cerebro de varios ratos em cada cobaia, dividindo-se em regra o material de accordo com a especie do rato e sua proveniencia. As cobaias eram submettidas a observação, sendo sua temperatura registada diariamente e sempre á mesma hora. Decorridos, em media, 20 a 30 dias, eram submettidas á prova de immunidade, com a inoculação de virus de passagem, seguramente activo e sempre com testemunhas, representando a dose inoculada mais de 1000 D. M. I. (doses minimas infectantes).

A existencia da immunidade nesta prova com a testemunha positiva era considerada indicio da infecção, embora benigna e muitas vezes sem reacção febril, determinada pela inoculação dos cerebros dos ratos. As que apresentavam reacção febril eram sangradas para passagem do virus porventura existente.

Resultados das inoculações experimentaes e discussão

Fizemos até agora inoculação de cerebros de 128 ratos capturados na zona suburbana ou rural (em casas de onde haviam sahido casos confirmados, ou em suas proximidades) e 24 ratos provenientes da zona urbana da cidade. O quadro annexo resume as experiencias.

Da 1.ª serie (zona suburbana ou rural) apenas podemos concluir pela existencia do virus em 2 grupos; o grupo constituido pelos *Epimys norvegicus* 8 e 9, capturados ao mesmo tempo em uma mesma casa da zona infectada, na rua do Futuro, em Villa Magdalena, os quaes, foram sacrificados sendo a emulsão dos cerebros de ambos inoculada na cobaia 377, a qual não apresentou reacção febril, mas se mostrou immunizada ao ser reinoculada, 26 dias depois, com dose elevada do virus, infectante para muitas testemunhas.

O segundo grupo é o constituido pelos *Epimys norvegicus* 98, 99 e 100, dos quaes os dois primeiros provinham da Estrada do Cotia e o ultimo da rua Oscar Freire. A emulsão do cerebro desses ratos, inoculada na cobaia 469, não determinou infecção apparente, mas a cobaia mostrou-se, do mesmo modo que a 377, perfeitamente immune a uma nova inoculação de dose massiça do virus feita 21 dias depois.

E' sabido que a immunidade nas infecções do grupo do "typhus", desde que não seja obtida com as "rickettsias", que possuem propriedades antigenicas, só se estabelece como consequencia de uma infecção, mesmo benigna.

Isto provavelmente aconteceu com os resultados positivos assignalados, nos quaes o "virus" inoculado com o cerebro dos ratos provocou uma infecção benigna, com ligeira reacção febril ás vezes, sem reacção outras, porém sufficiente para determinar a immunidade da cobaia em relação a dose seguramente infectante do virus de passagem.

Mesmo nesta hypothese, verifica-se que a porcentagem de ratos possiveis portadores do virus e provenientes da zona suburbana e rural é pequena, apenas 1,5 %.

Um dos resultados, considerado duvidoso, com cerebro dos ratos 125 a 128, somente não é dado como positivo em virtude de termos verificado concomitante infecção da cobaia com toxoplasma, apezar de termos obtido passagem da infecção para um segundo animal, sendo que na terceira passagem a morte da inoculada teve logar prematuramente, apresentando o animal phenomenos de paralysia.

Nos casos de resultado considerado positivo, póde ser objectado que a cobaia, depois de inoculada com o virus para prova de immunidade, tenha tido uma infecção inapparente, e que se deveria ter feito inoculação do seu sangue em outras cobaias para provar a ausencia do virus. Reconhecemos a validade da objecção, embora a raridade destas formas e a dose elevada do virus inoculada torne pouco provavel a hypothese invocada, pois outras cobaias e a testemunha inoculadas no mesmo dia, como se vê no quadro, apresentaram infecção caracteristica.

Por estes resultados seria licito considerar o rato como possivel depositario do virus, sendo muito provavel que outros existam entre os roedores silvestres, talvez mesmo desempenhando entre nós papel mais importante na propagação da infecção na zona rural ou suburbana da capital. Este modo de ver encontra justificativa no facto de os ratos colhidos nessa zona da cidade, fóco da infecção, serem muito pobres em pulgas, apontadas como transmissoras do typho endemico, quasi tambem não sendo parasitadas pelo acariano *Liponyssus bacoti* (Hirst), responsabilizado tambem pela sua transmissão, porém, somente pelo *Echinolaelaps echidninus* e *Laelaps nuttalli*, ainda não incriminado em qualquer parte do mundo.

Por outro lado, verificámos que o *Liponyssus bacoti* é extraordinariamente frequente nas preás, *Cavia aperea*, que são facilmente encontradas nesta principal zona infectada.

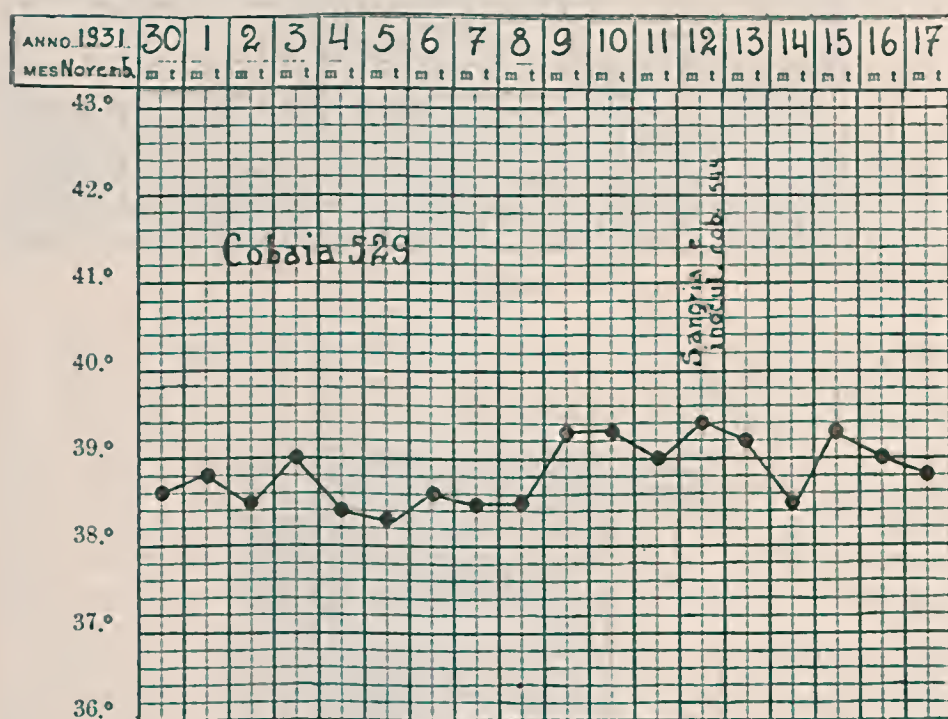
Sómente novos estudos, já iniciados, mostrarão si estes outros roedores podem tambem desempenhar o papel de depositarios do virus e a importancia que poderá ter o *Liponyssus bacoti* assim como outros acarianos, como transmissores do typho de São Paulo.

Os resultados da 2.ª serie de experiencias apresentam tambem interesse não pequeno, tendo sido feitas com ratos provenientes da zona urbana da cidade (Rua Florida), capturados em uma casa, donde sahira um caso da infecção e num moinho de trigo e deposito de cereaes da vizinhança. O caso clinico foi confirmado e se manifestou de forma benigna.

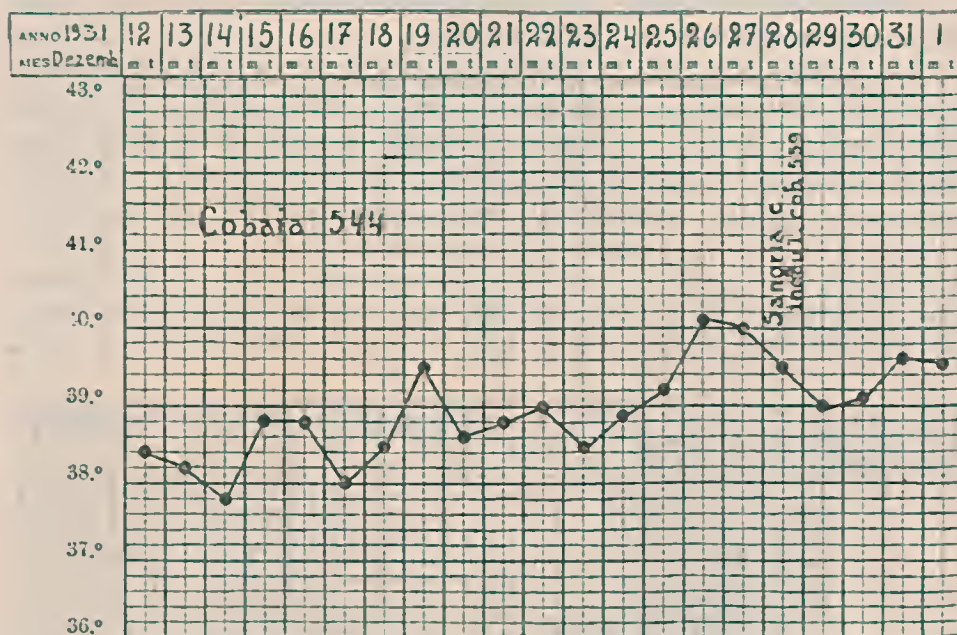
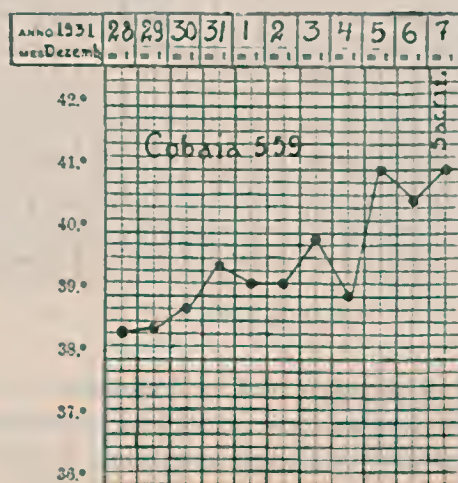
Os ratos desta proveniencia eram extremamente parasitados por pulgas.

A pesquisa do virus no cerebro foi feita somente em 24 destes roedores (*).

Neste numero, reduzido relativamente ao da primeira serie, já obtivemos, pelo menos, um resultado de certa significação.

Os cerebros dos ratos (*Epimys norvegicus*) 132 e 133 inoculados na cobaia 529, determinaram reacção febril acima do normal depois de um periodo de incubação de 8 dias. A evolução da reacção não foi, porém, muito semelhante á provocada pelos virus que estudámos (isolados de doentes da zona suburbana ou rural); a temperatura, embora acima da media normal, mostrou o maximo de 39°8 e apresentou remissões durante certos dias (graphico 8). A existencia deste outro typo de virus, determinando na cobaia uma infecção com evolução mais lenta e mais benigna, ficou bem demontsrada pelas passagens já feitas, em numero de 4 até agora. A cobaia 529, no 12.° dia após a

Graphico 8

inoculação dos cerebros de ratos, com a temperatura de 39°4, foi sangrada no coração e 4 cc. de sangue foram inoculados na cobaia 544. Esta ultima (graphico 9), após incubação de 13 dias, apresentou reacção febril durante varios dias, attingindo em alguns a temperatura 40°1. No 3.° dia de reacção febril

(*) Por um lapso foi dado anteriormente este numero, o que agora corrigimos, rectificando-o para 20. Esse menor numero dos exemplares pesquisados mais salienta a proporção de resultados positivos com estes roedores da zona urbana.

Graphico 9

Graphico 10

foi sangrada, sendo inoculada com seu sangue (4 cc.) a cobaia 559. Esta apresentou, no 6.° dia da inoculação. 39°9; no 7.°, 39°; no 8.°, 41°; no 9.°, 39°5 e no 10.°, 41.°, graphico 10. Neste dia foi sacrificada, notando-se na necropsia a existencia de esplenomegalia caracteristica, sendo inoculadas, para 4.ª passagem do virus, a cobaia 573, com 4 cc. de sangue e a cobaia 574, com emulsão de cerebro. Estas duas estão, ao ser escripta esta nota, no 4.° dia de inoculação.

A primitiva cobaia, 529, foi reinoculada com o virus de passagem seguramente activo e proveniente do doente da zona suburbana ou rural, depois de 35 dias da inoculação com os cerebros dos ratos. Não apresentou reacção febril caracteristica (apenas um dia teve 40°), porém morreu na noite do 6.° para o 7.° dia. A pesquisa de rickettsia no peritoneo foi positiva.

Tambem a cobaia da 2.ª passagem foi reinoculada com o mesmo virus decorridos 23 dias. Apresentou reacção no 3.° e 4.° dias (40° e 39°7), continuando viva.

A pesquisa de rickettsia no peritoneo na cobaia da 3.ª passagem (virus urbano) e que foi sacrificada, deu resultado negativo.

As pesquisas com este novo virus, proveniente de ratos capturados na zona urbana da cidade, estão sendo continuadas. Do que já foi verificado e resumido acima, póde-se pensar que, immunologicamente, o virus da zona urbana seja tambem differente do virus oriundo de doentes da zona suburbana ou rural. De outro grupo de ratos (ns. 138 e 139) foi isolado novo virus murino, apresentando o mesmo comportamento (*).

Estes resultados experimentaes, embora sob certo ponto de vista não possam ser considerados definitivos, trazem algum apoio á hypothese, já emittida por um de nós (17), da possibilidade de o typho exanthematico de S. Paulo se manifestar sob duas formas, talvez distinctas pelo seu aspecto clinico, immunologico, pathogenico e epidemiologico, como acontece com o typho tropical dos Estados Malaios. Neste, as duas formas (urbana e rural) foram definidas, primeiramente, em virtude dos resultados da reacção de Weil-Felix praticada com os typos de *Proteus* X19 e XK (Kingsbury) e, depois, pelo estudo experimental dos virus.

Estes estudos devem ser continuados entre nós e emprehendidos novos, afim de serem bem estabelecidas as relações entre estas duas possiveis formas da infecção; si representam apenas uma variação de virulencia do mesmo virus ou si são devidas a virus differentes, sendo diversas as infecções, embora pertencentes ao mesmo grupo.

RESUMO

1. Baseados em provas de immunidade e no resultado de pesquisas anteriormente feitas e já assignaladas, somos levados a acreditar na possibilidade

(*) O estudo deste virus consta de outro trabalho onde foram feitas as considerações e conclusões que comporta.

de serem os ratos, talvez, depositarios do virus do typho exanthematico de São Paulo.

2. Em relação á infecção manifestada na zona suburbana ou rural da capital, embora admittido o papel dos ratos, outros possiveis depositarios do virus devem ser pesquisados entre roedores silvestres, conforme indicação dos resultados do estudo da fauna de ectoparasitas nelles encontrada.

3. Quanto á infecção manifestada na zona urbana, o papel do rato como depositario do virus, parece-nos ter sido o melhor demonstrado, embora ainda não definitivamente.

4. A hypothese de uma diversidade de infecções, de accordo com o meio suburbano ou rural e urbano, justifica-se pelo comportamento dos respectivos virus, sendo o que foi isolado de ratos da zona urbana, já na 4.ª geração, muito menos pathogenico para a cobaia do que o já estudado e isolado de doentes provenientes da zona suburbana ou rural.

5. Somente os resultados de estudos clinicos e immunologicos (reacções sorologicas com os differentes typos de *Proteus* X), assim como a continuação das pesquisas experimentaes e epidemiologicas, confirmarão de modo definitivo a hypothese suggerida na conclusão anterior.

ABSTRACT

In the course of three new series of experiments undertaken with a view to finding out not only if certain species of Ixodid might carry the São Paulo typhus under experimental conditions (series I) and if some Arthropoda were naturally infected with its virus (series II), but also if rats might play the rôle of host to the virus (series III), new facts have come to light which may be summarized as follows:

Series I

1. *Amblyomma cajennense* (Fabr.) fed on a guinea-pig infected with the São Paulo typhus is capable of transmitting this infection to another guinea-pig, provided that it be crushed thirteen days after its feeding and be inoculated into this animal; the infection of this Ixodid, however, is not constant.

2. Larvae, hatched from eggs laid by an infected female of *Amblyomma cajennense*, upon inoculation into guinea-pigs, cause these to develop an inapparent infection as shown by the inoculation of the brain of these pigs into normal ones.

3. The only attempt to infect *Argas persicus* (Oken) was negative.

4. *Ornithodoros rostratus* Aragão may occasionally become infected by experimentally feeding on a guinea-pig at the infecting stage.

5. The sting of *Ornithodoros rostratus* thirteen days following its infection is infecting for the guinea-pig.

6. The sting of the same specimen of *Ornithodoros rostratus*, however, may not be infecting twenty-eight days following its contaminating feeding.

7. In the coxal liquid of an infected *Ornithodoros rostratus* is found the virus with infecting (immunizing) power for the guinea-pig.

8. The period of incubation in the guinea-pig's experimental infection by sting of an infected *Ornithodoros rostratus* is longer than that generally following intra-peritoneal inoculation of the virus into a guinea-pig.

Series II

1. It is very unlikely for *Pediculus capitis*, *Pulex irritans* and *Cimex lectularius* to play the rôle of natural carriers of the virus of the São Paulo typhus, to judge from experiments made with the inoculation, into guinea-pigs, of specimens taken from patients, their beds or members of their family.

2. This conclusion holds good also for the following Arthropoda as captured in freedom or on rats, dogs, cats and chicken at infected places:

Pulicidae: *Xenopsylla cheopis*, *Xenopsylla brasiliensis*, *Ctenopsyllus musculi*, *Ceratophyllus fasciatus* and *Craneopsylla minerva*, as captured from rats and *Ctenocephalides felis* from dogs, cats and rats.

Pediculidae: *Linognathus piliferus*, dog's louse.

Ixodidae: *Amblyomma ovale* and *Rhipicephalus sanguineus*, dog's ticks, and *Boophilus microplus*, ox' tick, the latter at larval stage and captured in freedom.

Parasitidae and Dermanyssidae: *Echinolaelaps echidninus*, *Laelaps nuttalli* and *Liponyssus bacoti*, as captured on rats, the last species also on "preás" (*Cavia aperea*); *Liponyssus bursa*, as captured on chicken.

3. In the light of the fauna of ectoparasites found in the city districts, either rural or urban, where the infection has been reported, it appears that the ordinary carrier of the virus must be the rat's fleas in the urban districs, whilst this rôle must be played by some mite, either Dermanyssid (*Liponyssus bacoti*) or Ixodid, in the rural section. This hypothesis seems to be justified both by the epidemiology of the São Paulo typhus and the experimental behaviour of its virus; anyway, it coincides with the apparent specificity of the virus found in either section, thus rendering necessary the undertaking of new experiments in this regard.

Series III

1. Rats seem to be the hosts of the virus of the São Paulo typhus to judge both from immunological cross-reactions and from the result of experiments previously reported on.

2. The ectoparasitic fauna found on some wild rodents seems to indicate that these may play the rôle of host to the virus in the rural section of this city.

3. However, house rats chiefly seem to play this rôle in the urban section according to experiments made although not very conclusive yet.

4. The behaviour of the virus isolated either in the rural or in the urban districts is different, the latter having become, in its fourth generation, much less pathogenic for the guinea-pig than the former.

5. The confirmation of the diversity of the type of typhus infection found in the urban districts from that reported from the rural section depends on further clinical and epidemiological study supplemented with a more complete experimentation.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Durand, P. & Conseil, E.* — Arch. Inst. Pasteur Tunis XX(1):54.1931.
2. *Blanc, G. & Caminopetros, J.* — C. R. Acad Sciences CXCII(25):1682.1931.
3. *Joyeux, Ch. & Pieri, J.* — C. R. Acad. Sciences CXCII(11):705.1931.
4. *Zinsser, H. & Castoneda, M. R.* — J. Exper Medicine LIV(1):11.1931.
5. *Mooser, H. & Dummer, C.* — J. Inf. Diseases XLVI(2):170.1930
6. *Maxcy, K. F.* — Public. Health Rep. XLIII:3079; XLIV:589.1929; XLIV:1735.1929.
7. *Zinsser, H. & Castaneda, M. R.* — J Exper. Medicine LII(5):661.1930.
8. *Durond, P. & Conseil, E.* — Arch Inst. Pasteur Tunis XX(1):54.1931.
9. *Dyer, R. E. & Badger, L. F.* — Science LXXIII(1886):10.1931.
10. *Mooser, H.; Castaneda, M. R. & Zinsser, H.* — J. Exper. Medicine LIV(4):567.1931.
11. *Rocha Lima, H. da* — Handbuch der path. Rick. Kolle e Wassermann, Bd. VIII: 1347.1930.
12. *Fonseca, F. da* — Apresentação á Semana do Laboratorio da Soc. Med. & Cir. de São Paulo. Janeiro 1932.
13. *Dove, W. E. & Shelmire, B.* — J. Amer. Med. Assn. XCVII(21):1506.1931.
14. *Mooser, H.; Castaneda, M. R. & Zinsser, H.* — J. Amer. Med. Assn. XCVII(4): 231.1931.
15. *Dyer, R. E.; Rumreich, A., & Badger, L. F.* — Science LXXIII(1886):10.1931; Publ. Health Rep. XLVI:334.1931.
16. *Kemp, H. A.* — J. Amer Med. Assn. XCVII(11):775.1931.
17. *Monteiro, J. Lemos* — Brasil Medico XLV(47):1906.1931; Mem. Inst. Butantan VI: 1.° art.1931.

Este trabalho, agora revisto, foi apresentado á Semana de Laboratorio da Soc. Med. & Cir. de S. Paulo (Janeiro de 1932), em 3 Notas, resumidas em publicações in Brasil Medico XLVI (3): 49.1932; XLVI (8): 169.1932 e XLVI (9): 193.1932.

(Trabalho das Secções de Virus e de Parasitologia do Instituto Butantan, dezembro de 1931).

Mem. Inst. Butantan
Vol. VI, 1931

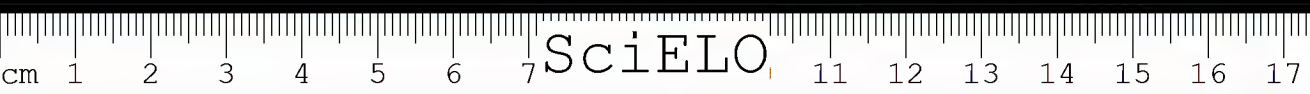



Fig. 1

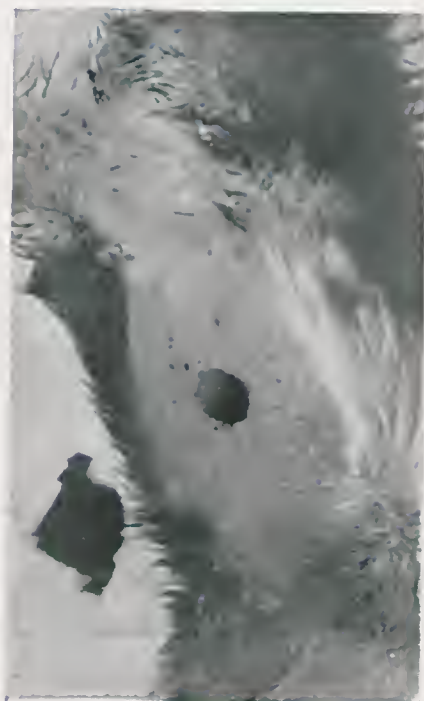
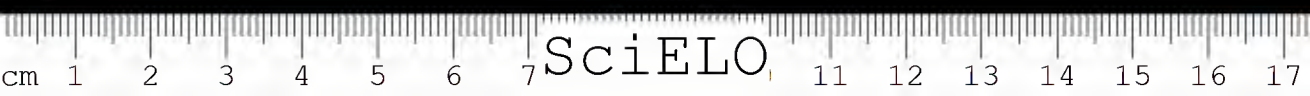



Fig. 2

Figs. 1, 2 — Alimentação de **Ornithodoros rostratus** em cobaia

ESTUDOS SOBRE OPHIDIOS NEOTROPICOS

XXVIII. Commentarios a proposito de alguns boideos

POR

AFRANIO DO AMARAL

598.121

ESTUDOS SOBRE OPHIDIOS NEOTROPICOS

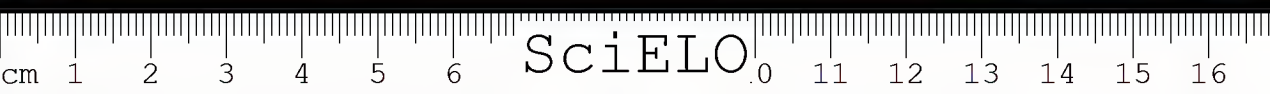
XXVIII. Commentarios a proposito de alguns boideos

POR

AFRANIO DO AMARAL

Em um artigo publicado recentemente no Bulletin of the Antivenin Institute of America (1), a distincta ophiologa, Olive G. Stull, criticou minha maneira de encarar algumas formas neotropicas de Boideos, versadas em tres de minhas ultimas publicações (2, 3, 4).

Embora limitado sobretudo ao genero *Tropidophis* e nelle directamente interessado, o artigo de Stull contém certos reparos, particularmente a proposito da synonymização por mim usada ao tratar da maioria das "formas das Indias Occidentaes, que quasi não se acham representadas nos museus sul-americanos" e "daquellas que se conhecem apenas pela literatura", de sorte que me acho na obrigação de examinar esses pontos antes de iniciar a analyse de seu trabalho.

Desde 1922, quando comecei meu estudo de revisão das serpentes neotropicas no Museu de Zoologia Comparada (Universidade de Harvard), graças á generosa hospitalidade do professor Thomas Barbour, até 1928, quando voltei finalmente para o Brasil, tratei de aproveitar da melhor maneira o meu tempo e a opportunidade que se me deparava, para examinar criticamente e tomar notas sobre grande numero de exemplares existentes na collecção daquella instituição, que é bastante rica em material antilhano. Visitei igualmente, em varias occasiões, o Museu Nacional dos Estados Unidos (Instituição Smithsoniana) e ali examinei muitos exemplares, inclusive, naturalmente, numerosas especies caraibas, nelle tão bem representadas; porisso, apresento aqui meus agradecimentos ao dr. Leonhard Stejneger e sua assistente Doris Cochran, pelas facilidades de que cercaram o meu estudo. Ainda mais, antes de preparar minha Lista Remissiva de Ophidios Neotropicos (publicada no t. IV destas Memorias), consultei toda a bibliographia da materia e tive a rara felicidade de poder completar a minha experiencia pelo exame, virtualmente, de todos os typos de ophidios neotropicos contidos nos museus sul-americanos, norte-americanos e

europeus; as unicas excepções a essa regra eram representadas por aquelles typos que, no momento de minhas visitas, estavam ausentes por emprestimo ou não puderam ser encontrados por motivos varios.

Por conseguinte, Stull estava enganada quando acreditou que a minha experiencia dos ophidios antilhanos repousava em especimes porventura representados "nos museus sul-americanos" ou, então, apenas em meu conhecimento da "literatura". Apparentemente, Stull, ou não leu os trabalhos que citou, ou, si os leu, não comprehendeu o que eu escrevi; do contrario, ella teria achado a sobredita explicação do plano que eu segui no meu trabalho de revisão, na introducção mesma dos tres artigos que ella citou em sua nota (2, 3, 4).

Tratando agora da parte propriamente systematica de seu artigo, devo accentuar desde logo que, embora dedicando metade do seu trabalho á discussão de alguns pontos concernentes ao genero *Tropidophis* — talvez porque este já fôra objecto de sua unica revisão (5), Stull affirmou que os erros menos justificaveis e mais importantes por mim commettidos no tratamento dos Boideos diziam respeito ao genero *Epicrates*, exemplificando essa sua affirmação com as especies *H. striatus* Fischer, *E. monensis* Zenneck, *E. subflavus* Stejneger, *E. wieningeri* Steindachner e *E. sabogae* Barbour.

Quanto a *H. striatus* Fischer, eu apenas segui o parecer de Meerwarth (6) que, em 1901, mostrou ser esta uma variedade, especificamente synonyma de *E. angulifer* Bibron. Ao que eu saiba, nenhum outro especialista desde então se occupou daquella forma e ninguem provou, por meio de uma revisão satisfactoria, a incorrecção do opinar de Meerwarth. Portanto, agi da maneira mais sensata possivel em collocando *H. striatus* na synonymia de *E. angulifer* Bibron.

Sem duvida, entre diversos enganos commettidos na primeira edição de minha Lista Remissiva, o nome "Santo Domingo", que representa seguramente a localidade mais importante na distribuição de *angulifer*, foi omittido em minha correcção de provas, na qual passaram sem emenda as graphias incorrectas *wrightii*, em vez de *wrighti*, e *semicincta*, em logar de *semicinctus*. Cumpre-me, pois, agradecer a Stull a indicação destes enganos, coherente com um pedido que fiz, na introducção daquella minha monographia (4), aos meus collegas, para que assignalassem quaesquer erros ou omissões que encontrassem no texto, contribuindo, assim, para a melhora da Lista Remissiva, em beneficio de todos os especialistas.

Em seguida, Stull accentuou: "A forma *chrysogaster* Cope, representada por quatro exemplares do Museu de Zoologia Comparada de Harvard, e que eu considero subespecie valida de *striatus*, não é siquer mencionada".

Em resposta devo dizer que, na synonymia de *Epicrates fordii* (Günther), citei *sem restricção* o nome usado no tratado de Boulenger. Desde que eu não accrescentei uma nota "*pro parte*" ou "*partim*" áquelle nome, pensava que todos os biologos comprehenderiam que eu havia concordado automaticamente com a synonymia de *fordii*, constante do trabalho de Boulenger, inclusive, por-

tanto, *H. chrysogaster* Cope. Assim sendo, deve-se concluir que Stull, ou não comprehende, ou não segue, o systema universal de citações em materia de nomenclatura. Igualmente quando terminei minha Lista Remissiva dos Ophidios Neotropicos, em maio de 1930, não poderia eu prever que *chrysogaster* viesse a se tornar subespecie valida de *striatus*, porquanto Stull só emittiu sua opinião a esse respeito em setembro de 1931. Todavia, mesmo que eu possuisse o dom de adivinhar, eu não estaria obrigado a concordar com o seu ponto de vista, si ella não houvesse delle demonstrado a razão de ser de uma maneira satisfactoria. Indiscutivelmente escapa ás finalidades de qualquer lista remissiva propor alterações ou mesmo seguir apressadamente modificações outras que não hajam ainda resistido á prova do tempo.

De referencia a *E. monensis*, Stull affirmou que: "A forma *Epicrates monensis* Zenneck apparece na synonymia de *E. fordii* (Günther), embora della se possa distinguir, não só pela coloração, sobretudo pelo numero bem menor de manchas dorsaes, mas tambem pelas differenças apparentemente constantes no numero de escamas dorsaes, de ventraes e caudaes, o que pareceria justificar-lhe pelo menos uma collocação subespecifica".

Por consequencia, Stull não estava ainda bem segura, quer da constancia dos caracteres differenciaes que indicou, quer da posição systematica a ser occupada pela forma cuja validez ella defende. Neste particular tambem acompanhei Meerwarth (loc. cit., p. 8), que considerou *monensis* apenas como variedade de *E. fordii*. Desde que, por motivos obvios, não é usual, nem aconselhavel, incluirem-se variedades em listas remissivas, aquella forma de Zenneck foi posta na synonymia de *fordii*, dada a inexistencia de qualquer revisão satisfactoria a respeito. Ainda sobre este ponto eu deveria accentuar que o proprio Schmidt (7), que acceita a validez de *monensis*, indicou recentemente que "o esclarecimento do estado das relações desta especie caberá a um revisor do genero, que tenha á mão exemplares das varias especies dominicanas".

No tocante a *E. subflavus* Stejneger, achei preferivel não a reconhecer como tal, para não precipitar o meu juizo, na falta de uma revisão, sobre a sua validez, tanto mais quanto são bem conhecidas as enormes variações apresentadas pelas serpentes insulares, variações que explicam a extrema subdivisão que a fauna ophiologica antilhana tem soffrido nas mãos de varios herpetologos.

E' certo haver Stejneger baseado a diagnose de *subflavus* sobretudo no intimo contacto das prefrontaes com a preocular; todavia, o material que teve em mão pareceu-lhe insufficiente a uma completa verificação diagnostica, conforme se deprehende da seguinte annotação (8):

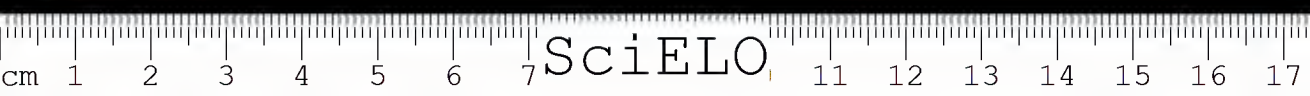
"A coloração tambem é bastante differente e ha outros numerosos caracteres na escutellação, cuja constancia só se póde demonstrar em face de um material mais abundante do que o presente no momento". Portanto, a inclusão de *subflavus* na synonymia de *inornatus* talvez tenha a vantagem

real de provocar uma revisão meticulosa deste grupo, sobremodo confuso, de serpentes e facilitar, assim, o trabalho de futuros especialistas.

A proposito de minha maneira de encarar *E. wieningeri*, eis o commentario de Stull: "*Epicrates wieningeri* Steindachner, especie paraguaya conhecida somente pelo typo, foi fundida com *Eunectes notaeus* Cope simplesmente talvez porque occorre na patria de *notaeus* e apresenta um numero correspondente de filas de escamas e um desenho algo semelhante".

Ainda aqui, Stull, ou não leu o que eu escrevi acerca de *wieningeri*, ou, si o leu, não poude ligar as idéas por mim expostas. Embora *E. wieningeri* não possa de maneira alguma ser incluida entre "formas antilhanas que não estão, quasi inteiramente, representadas nos museus sul-americanos", porquanto, primeiro, ella procede do Paraguay (facto que Stull deve conhecer) e, segundo, representa um estricto synonymo de *E. notaeus* Cope (forma relativamente commum em nossas collecções), ainda assim não posso deixar passar sem reparo o facto de eu não me ter referido a qualquer "desenho", ao comparar *wieningeri* com *notaeus*. Conseguintemente, a affirmação de Stull no particular é inteiramente gratuita. A opinião por mim emittida (p. 9) sobre *E. wieningeri*, em meu trabalho (2), foi, textualmente, a seguinte: "Esta especie, baseada num exemplar jovem procedente de Altos, no Paraguay, caracteriza-se principalmente pela presença de 47 filas de escamas dorsaes. Trata-se, indiscutivelmente, de um mero synonymo de *Eunectes notaeus*, especie que é a representante do genero no valle do Paraguay, enquanto *E. murinus* é propria dos valles do Amazonas, São Francisco e Paraná". Ao examinar o typo de *wieningeri* no Museu de Historia Natural de Vienna, em presença de meus prezados collegas Otto Wettstein e Franz Werner, aos quaes demonstrei o engano commettido por Steindachner, verifiquei com segurança ser aquelle typo um estricto synonymo de *notaeus*. Esta foi realmente a idea que eu procurei justificar.

Desde que estou a occupar-me desta especie, devo aproveitar o ensejo para dizer que a variação de suas placas subcaudaes vae de 46 a 59, o numero mais baixo tendo surgido a Serié (9, 10), em uma serie de exemplares por elle examinada, e o mais alto, em outra ora á minha disposição e cujo numero de ventraes oscilla entre 218 e 244. Nestas condições, a variação definitiva de 55 a 59 para as subcaudaes e a de 218 a 231 para as ventraes, ambas citadas por Stull, estão incorrectas. A pequena differença encontrada no numero das subcaudaes (64, inclusive diversas placas divididas, no typo de Steindachner, a contrastar com 59, encontrado em duas series relativamente pequenas de *notaeus*) não justifica a validez de *wieningeri*, que não se póde distinguir da typica *notaeus* por qualquer outro caracter.

Stull considera que a inclusão de *E. sabogae* Barbour na synonymia de *Constrictor constrictor imperator* está em desaccordo com o meu reconhecimento de subespecies brasileiras, baseadas apenas em côr, e isto porque: "Deve-se lembrar que nada menos de oito novas subespecies de *Bothrops neuwiedii* Wagler

foram descriptas, em correspondencia com outros tantos Estados brasileiros, no trabalho do doutor Amaral, relativo a envenenamento por accidentes, baseadas em differenças de desenho e coloração, e que todas ellas foram conservadas nos artigos ora discutidos."

Como resposta, devo dizer, em primeiro logar, que esta nota difficilmente me é applicavel, pois presumo que uma analyse imparcial da moderna litteratura ophiologica mostraria, não somente que eu tenho sido um dos especialistas mais avessos a descripções baseadas apenas em coloração — attitude essa que tem até sido objecto de critica (11) —, sinão tambem que eu fui talvez o primeiro ophiologo a recorrer a provas de precipitina e a estudos physio-immunologicos de venenos, como auxilio ao estabelecimento da diagnose de serpentes (12, 13 e 14). Em segundo logar, não devo deixar passar esta opportunidade para declarar que, ao me decidir a publicar a descripção daquellas subespecies de *Bothrops neuwiedii*, eu já havia tomado a precaução de praticar provas de soro-precipitação, para poder conferir as conclusões a que chegara, ao exame de uma grande serie de *exemplares vivos* daquellas formas. Este trabalho, por mim iniciado em 1921-1922, está sendo continuado em collaboração com um dos assistentes (J. Travassos) deste Instituto e está produzindo resultados bem interessantes, cuja publicação reservamos para muito breve.

Tendo até agora visto mais de cem mil serpentes vivas (só este anno o Instituto Butantan recebeu cerca de vinte mil exemplares nessas condições), tornei-me tão sceptico a respeito do valor e caracteres chromaticos que, quando possivel, recorro a quaesquer outros meios de identificação. Sem duvida, fui coherente ao synonymizar *E. sabogae* com *C. constrictor imperator*, da qual a primeira não se póde distinguir: as variações encontradiças no colorido de formas insulares são tão profusas (capazes até de affectar, igualmente, certos caracteres anatomicos de menor valia), que considero apenas natural que exemplares de *imperator*, procedentes da ilha Saboga, apresentem um colorido mais indefinido ou pallido do que os oriundos do continente.

Infelizmente, Stull estava tão compenetrada do valor de coloração como caracter distinctivo, que a elle recorreu como argumento em todo o seu trabalho, confirmando, portanto, essa tendencia, já bem demonstrada ao versar o genero *Tropidophis* (5). Para provar esta minha affirmação, devo lembrar o commentario já feito a proposito de haver-me a auctora imputado, no caso de *E. wieningeri*, um argumento de ordem chromatica (differenças de desenho) em que eu siquer jamais pensei; cabe-me, em seguida, convidar o leitor a ler criticamente a monographia da auctora, sobre *Tropidophis*, e a defesa por ella apresentada (1) de todas as formas que reconheceu em 1928: basta isto para convencer qualquer especialista do abuso, por ella praticado, de differenças chromaticas na identificação de serpentes insulares.

Aos fins visados neste artigo resta-me agora declarar o meu scepticismo quanto ao valor porventura apresentado pelos caracteres dos dentes e pela con-

formação dos hemipenes, na differenciação, assim de serpentes tão nitidamente atrophiadas como as *Tropidophis*, como de exemplares conservados, identicos aos que Stull examinou para preparar a sua sobredita monographia.

Quanto aos caracteres dentarios, certamente todos os ophiologos experimentados conhecem os innumeros erros commettidos em descripções e oriundos das causas seguintes: dissecções imperfeitas de material improprio; esquecimento das differenças decorrentes da idade e das faltas da dentição devidas a luctas ou á alimentação; omissão de dentes não desenvolvidos ou de falhas naturaes na mandibula de exemplares estudados, etc.

No tocante aos caracteres hemipenianos, tenho encontrado differenças tão nitidas, *mesmo em material preparado de exemplares vivos*, que, por mais que eu me sinta tentado pela abundancia de especimes á mão, eu os tenho evitado usar na differenciação de serpentes. A essa variação accresce a circunstancia de serem muitas especies de ophidios conhecidas apenas pelo typo, que frequentes vezes é uma femea (♀); portanto, caso prevalecesse o criterio da identificação das especies pelos caracteres penianos, daquella circunstancia decorreria a impossibilidade da classificação definitiva de taes exemplares, a menos que se estabelecesse e logo se generalizasse em herpetologia um processo seguro de descripção de "formas provisorias", cuja incorporação final em systematica ficasse a depender da applicação daquelle criterio phallologico. O risco que se corre é naturalmente muito maior quando se usa este caracter peniano á luz da dissecção de exemplares conservados. Para provar esta minha affirmação eu poderia simplesmente aconselhar o leitor que procedesse a uma analyse critica de certas gravuras constantes da monographia fundamental de Cope sobre classificação de serpentes de accordo com a sua estructura hemipeniana. Para mostrar, com effeito, que, até em especies de grandes dimensões, a conformação dos hemipenes representa um criterio bastante falho para a distincção dellas, eu indicaria uma comparação, por exemplo, entre pl. XVI, fig. 7 e pl. XXI fig. 1 (da monographia de Cope), ambas pertencentes á mesma especie *Chironius fuscus* (L.); entre pl. XVIII, fig. 2 e pl. XVIII, fig. 3, ambas concernentes a *Drymobius boddaertii* (Sentzen) e, especialmente, entre pl. XVII, fig. 6 e pl. XIX, fig. 2, ambas relativas á especie *Drymobius dendrophis* (Schlegel)... A precariedade de tal caracter ainda mais se revela em serpentes pequenas, conforme parece sempre acontecer com as do genero *Tropidophis*.

Finalmente, devo declarar que, ao ler a monographia de Stull, achei inacceitaveis os grupos basicos A e AA propostos em sua "Chave das especies e subespecies do genero *Tropidophis*", em virtude de haver ella baseado o primeiro grupo na presença de "escamas dorsaes lisas, hemipenes bifurcados" e caracterizado o segundo pela presença de "escamas dorsaes carinadas, pelo menos nas filas vertebraes, hemipenes quadrifurcados", isto apesar de não ter examinado hemipenis algum das especies *paucisquamis* e *taczanowskyi*, nem visto um exemplar siquer de ambas, como, aliás, francamente confessou. Pouco

tempo depois de ter assim encarado o trabalho de Stull, deparou-se-me ensejo de confirmar minha recusa á acceitação daquella sua chave synoptica: ao examinar um exemplar vivo de *T. paucisquamis*, verifiquei positivamente (16) que as escamas dorsaes desta especie são de facto carinadas, ao contrario, pois, do que a auctora havia antecipado. Nessa occasião, eu escrevi: "Da revisão de Stull resultou o esclarecimento de algumas questões relativas, quer á distincção, quer á identidade de varias formas de *Tropidophis*. Infelizmente, algumas conclusões de seu trabalho deram-me a impressão de ser demasiado apressadas, a saber: a subdivisão extrema da especie *pardalis*, a descripção de *wrighti* como especie nova, baseada num unico exemplar que pode bem representar uma variação extrema de *pardalis*, e a separação, em dois grupos, das especies continentaes *paucisquamis* e *taczanowskyi*. Em sua opinião, esses dois grupos, cujos typos são, respectivamente, *maculatus* e *pardalis*, podiam caracterizar-se da seguinte maneira:

A. Escamas dorsaes lisas; hemipenes bifurcados — grupo *maculatus*.

AA. Escamas dorsaes carinadas, pelo menos na fila vertebral; hemipenes quadrifurcados — grupo *pardalis*.

"Desde que Stull declarou em seu trabalho não haver visto exemplar algum, seja de *paucisquamis*, seja de *taczanowskyi*, e desde que nenhum outro auctor jamais descreveu os caracteres penianos de qualquer destas especies, a separação dellas á luz desses caracteres não se justificaria de modo algum. Estou certo igualmente de que, á luz da carinação das escamas, *paucisquamis* e *taczanowskyi* não se podem agrupar separadamente, porquanto já verifiquei que o exemplar de *paucisquamis*, actualmente na collecção do Instituto Butantan, apresenta escamas carinadas sobre o dorso, justamente como acontece com *taczanowskyi*".

Consequentemente, da revisão de Stull apenas restam as variações numericas das escamas para lhe confirmar as conclusões relativas á subdivisão de *Tropidophis*. Este é o ponto que eu, baseado no conhecimento que tenho do genero, resolvi não acceitar, deixando-o primeiro resistir á prova do tempo. Concluindo, direi que, antes de algum revisor confirmar as conclusões de Stull, tenho por perfeitamente justificada a deliberação que tomei de omittir de minha Lista Remissiva de Ophidios Neotropicos os novos nomes creados pela auctora.

598.121

STUDIES OF NEOTROPICAL OPHIDIA

XXVIII. Remarks on some boid snakes

BY

AFRANIO DO AMARAL

TRANSLATION

In a recent article published in the Bulletin of the Antivenin Institute of America (1), the distinguished ophiologist, Olive G. Stull, criticized my views on some of the neotropical forms of Boidae as set forth in three of my latest publications (2, 3, 4).

Although mainly confined to and directly interested in the genus *Tropidophis*, Stull made some general critical statements particularly on my "ill-advised synonymizing" in dealing with most of "the West-Indian forms, which are almost unrepresented in the South American museums", "as well as those known only from the literature". The accuracy of these statements merits being examined before I enter into the analysis of her paper.

Since 1922, when I commenced my revisionary work on neotropical snakes at the Museum of Comparative Zoology, thanks to Prof. Thomas Barbour's generous hospitality in his laboratory, until 1928, when I definitely returned to Brazil, I made the best use of my time and the opportunity to examine critically and to take notes on a great many specimens in the collection of that institution, which is quite rich in Antillean material. On various occasions I also visited the United States National Museum and examined many specimens, including, of course, a great many West-Indian forms which are also well represented there. I am grateful to Dr. Leonhard Stejneger and Miss Doris Cochran for permission to do so. Moreover, before preparing my Check-list of Neotropical Snakes, I was successful in gaining access to the complete bibliography of the subject and to supplement my experience by the examination of virtually all types of neotropical ophidia as contained in the South American, North American and European museums, the only exceptions being those types

which either were away on loan or could not be located at the time of my visits.

Therefore, Stull misrepresented the matter when she thought my experience of Antillean ophidia to be based on specimens perchance represented "in the South American museums" or else on my knowledge of "the literature". Apparently Stull either did not read the papers she quoted, or, if she read them, did not understand what I wrote, otherwise she would have found the explanation I gave above of the plan I followed in my revisionary work, in the very introduction of all of the three papers she cited in her article (2, 3, 4).

Turning now to the very scientific statements of her critical article, I may first say that, although devoting half of her article to the discussion of some points regarding the genus *Tropidophis*, perhaps because this had already been reviewed by herself (5), Stull stated that the least justifiable and the greatest errors I made in dealing with the Boidae are found in the genus *Epicrates*, a statement she exemplified with the species *H. striatus* Fischer, *E. monensis* Zenneck, *E. subflavus* Stejneger, *E. wieningeri* Steindachner and *E. sabogae* Barbour.

In regard to *H. striatus* Fischer I followed Meerwarth (6) who, in 1901, showed that this is a variety and the name a synonym of *Epicrates angulifer* Bibron. As far as I am aware no other specialist has since dealt with this form, nor has anyone proved, through a satisfactory revision, Meerwarth's finding to be incorrect. Therefore, I followed the most sensible course in the matter on placing *H. striatus* in the synonymy of *E. angulifer* Bibron.

No doubt, among many slips found in my List, the name "Santo Domingo", which is of course the most important locality in the *angulifer* range, was omitted in my proof-reading, in which the incorrect spellings *wrightii* (instead of *wrighti*) and *semicincta* (instead of *semicinctus*) also passed unnoticed. I am much indebted to Stull for pointing out these mistakes. As I wrote in the introduction of the first edition of my monograph (4), I asked all my colleagues the special favour of pointing out any errors or omissions they might find in the text so as to help improve that List for the benefit of all.

Stull next wrote: "The form *chrysogaster* Cope, represented by four specimens in the Museum of Comparative Zoology at Harvard, and which I consider a valid subspecies of *striatus*, is not even mentioned".

In dealing with the synonymy of *Epicrates fordii* (Günther), I quoted without restriction the name given it in Boulenger's catalogue. Since I did not add a "*pro parte*" or "*partim*" to the quotation of that name I thought that every biologist would understand that I had automatically agreed with the synonymy of *fordii* as recognized by Boulenger, including of course *H. chrysogaster* Cope. Therefore, it is apparent that Stull either does not comprehend or does not follow the universal system of nomenclatorial quotations. On the other hand, when I finished my check-list of neotropical ophidia in

May, 1930, I could not foresee that *chrysogaster* would ever become a valid subspecies of *striatus*, because Stull made her opinion known only in September, 1931. Even had I possessed such a divinatory instinct, I was not obliged to agree with her if she had not proved the correctness of her standpoint in a satisfactory manner. Indeed, it is not the scope of any check-list to initiate or even to follow hastily any proposed modifications that have not yet stood the test of time.

In reference to *E. monensis*, Stull stated that: "The form *Epicrates monensis* Zenneck is synonymized with *E. fordii* (Günther), although it can be distinguished from the latter not only by its coloration, particularly the considerably smaller number of dorsal spots, but also by apparently constant differences in the numbers of scale rows, ventrals, and caudals, which would seem to entitle it to at least subspecific rank".

Therefore, Stull was not yet sure about either the constancy of those differences she indicated or the rank to be definitely assigned to the form the validity of which she defended.

In this case I also followed Meerwarth (*loc. cit.*, page 8) who considered *monensis* but as a variety of *E. fordii*. Since, for obvious reasons, it is neither customary nor advisable for check-lists to recognize varieties, Zenneck's form was included in the synonymy of *fordii*, in the absence of a satisfactory revision of same. In this connexion I may as well point out that even Schmidt (7), who accepts *monensis* as a good species, has recently indicated that "the clearing up of the status of the relations of this species must be left to a reviser of the genus, with specimens of the several Santo Domingan species at hand".

In view of the well-known wide variations borne by island snakes, a fact which seems to be responsible for the considerable splitting that the Antillean ophiological fauna has undergone in the hands of several herpetologists, I found it to be advisable not to accept *E. subflavus* Stejneger as a full species, pending a revision that might prove its validity.

To be sure, Stejneger based the diagnosis of *subflavus* especially in the broad contact of the prefrontal with the preocular, but the material he had at hand appeared to be insufficient to any complete diagnostic verification for he (8) clearly stated: "The coloration is also quite different, and there are numerous other characters in the scutellation, the constancy of which can only be demonstrated by a larger material than I have access to at present". The placing of *subflavus* in the synonymy of *inornatus* may have the real merit of provoking a thorough revision of this most confusing group of serpents so as to facilitate the work of future specialists.

In relation to my treatment of *E. wieningeri*, Stull wrote: "*Epicrates wieningeri* Steindachner, a species from Paraguay known only from the type, is referred to *Eunectes notaeus* Cope, apparently simply because it occurs within

the range of *notaeus* and has a corresponding number of scale rows and a somewhat similar pattern".

Here again Stull either did not read what I wrote about *wieningeri* or, if she did, she could not make out my opinion. Although *E. wieningeri* could not in any way be included among "West-Indian forms, which are almost entirely unrepresented in South American museums" since it proceeds from Paraguay—a fact of which Stull is aware—and is a strict synonym of *E. notaeus* Cope—a form rather common in our collections—yet I cannot help pointing out that in my text I did not mention any "pattern" in the comparison I made between *wieningeri* and *notaeus*. Therefore, Stull's statement in this regard is entirely gratuitous. Indeed, the opinion I rendered (page 9) on *E. wieningeri* in my paper (2) is the following in plain English: "This species, as based on one young specimen proceeding from Altos, in Paraguay, is characterized principally by the presence of 47 rows of dorsal scales. It is undoubtedly a mere synonym of *Eunectes notaeus*, which is the representative of the genus in the Paraguay valley, whilst *E. murinus* is the one found in the Amazon, the São Francisco and the Paraná valleys". Having examined the type of *wieningeri* in the Vienna Museum in the presence of my esteemed colleagues Otto Wettstein and Franz Werner to whom I showed Steindachner's mistake, I positively verified that it was a strict synonym of *notaeus*. This is the thought I really tried to convey.

Since I am dealing with this form it may be proper to point out that the variation of its subcaudal count is 46-59, the former figure having been found by Serié (9, 10) in a series he examined and the latter in another I have at hand, the ventral count varying from 218 to 244. Therefore, Stull's definite figures 55-59 for the caudals and 218-231 for the ventrals are not correct. The slight difference noted in the number of subcaudals (64, including several divided shields, in Steindachner's type, as against 59 found in two by no means large series of *notaeus*) does not justify the validity of *wieningeri*, which can not be distinguished from typical *notaeus* by any other character.

Stull considers the inclusion of *E. sabogae* Barbour in the synonymy of *Constrictor constrictor imperator* to be highly inconsistent with my policy of recognizing Brazilian subspecies only by colour and this because "It will be remembered that no less than eight new subspecies of *Bothrops neuwiedii* Wagler, conveniently corresponding to as many Brazilian states, are described in Doctor Amaral's paper on snake poisoning on the basis of differences in pattern and coloration, and these are all recognized in the papers under discussion".

In reply, may I say, first, that this remark is hardly applicable to me, because I feel that an impartial analysis of the modern literature on snakes would disclose not only that I have been one of those who have shown the greatest dislike for descriptions of forms based only on colouration — an

attitude that has, as a matter of fact, been criticized (11), but also that I was perhaps the first specialist to resort to precipitin tests and venom physio-immunolical analysis as a help in the establishment of diagnosis of snakes (11, 13, 14). Second, I must take this opportunity to state that, when I decided to publish my article on the subspecies of *Bothrops neuwiedii*, I had already taken the precaution of checking the conclusions I arrived at on the examination of fairly large series of *live specimens*, with the necessary serum precipitin tests. This work, which I started in 1921-1922, has of late been continued in collaboration with one of my assistants (J. Travassos) at this Institute and is yielding very interesting results, the publication of which we anticipate for the near future.

Having thus far seen over one hundred thousand live snakes (this year alone the Instituto Butantan has received over 20,000 of such specimens), I have become so skeptical about colour characters that whenever possible I resort to some other means of identification. Therefore, I was consistent when I synonymized *E. sabogae* with *C. constrictor imperator*, from which the former can not be distinguished. The variations found in the colour of island forms are so profound (they sometimes may affect certain minor anatomical characters as well) that it is only natural that specimens of *imperator* taken on Saboga Island bear a more indefinite or pallid shade than the mainland ones.

Unfortunately, Stull was so imbued with the idea of colouration as a distinctive character, that she brought this forth as an argument throughout her paper in the same way that she did in dealing with the genus *Tropidophis* (5). To prove this point I have already commented on her having imputed to me, in regard to *E. wieningeri*, a pattern difference of which I even never thought. The reader is now invited to criticaly examine her monograph on *Tropidophis* and the defense she made (1) of all forms she recognized in 1928, to be convinced of how much she abused of colour differences in separating island snakes.

For the purpose of this article it seems to suffice now for me to state that, in the case of such nitidly dwarfed snakes as the *Tropidophes* as well as in the case of preserved material such as that Stull had access to in the preparation of her monograph, I am sceptical also about differences in tooth characters and hemipenial structure.

Indeed, in regard to tooth characters, all those who have sufficient experience with snakes know that many errors have crept into descriptions from the following causes: imperfect dissections of improper material; overlooking of age differences as well as of losses of teeth due to fights or feeding: omission of undeveloped teeth or else of natural gaps in both the maxillary and the mandible of the specimens under consideration, etc..

As regards hemipenial characters, I have found such wide differences, *even in material mounted from live specimens*, that much as I have been tempted by the abundance of material I have at hand, I have refrained from using them in the differentiation of snakes. To this variation I may add the fact of

many species of serpents to be known only from the type, which oftentimes is a ♀; therefore, should this criterion of identification of species in the light of their penial characters prevail, it would be impossible definitely to classify those type specimens unless a sound process of description of "provisional forms" were established and generally accepted in herpetology, the final incorporation of these forms into systematics remaining dependent on the application of that phallological criterion.

The risk one takes in attempting to use this phallic character as revealed by the dissection of preserved specimens is naturally much greater. To prove this contention I could refer the reader to a critical analysis of some of the figures in Cope's fundamental monograph (15) on the classification of snakes of which belong to *Drymobius boddaertii* (Sentzen), and particularly between pl. XVI, fig. 7 and pl. XXI, fig. 1, both of which belong to the same species *Chironius fuscus* (L.); between pl. XVIII, fig. 2 and pl. XVIII, fig. 3, both of which belong to *Drymobius boddaertii* (Sentzen), and particulary between pl. XVII, fig. 6. and pl. XIX, fig. 2, both of which belong to *Drymobius dendrophis* (Schlegel), are sufficient to show that even in large forms as those cited above, the hemipenis structure is a very uncertain criterion to be followed in the distinction of snakes. The precariousness of this character is naturally still more marked when one deals with small individuals as seems always to be the case with those of the genus *Tropidophis*.

Finally, I am obliged to state that, upon reading Stull's monograph, I could not accept the main groups A and AA as proposed in her "Key to the species and subspecies of the genus *Tropidophis*", because she based the former in the presence of "dorsal scales smooth, hemipenis bifurcate", and the latter, in the presence of "dorsal scales keeled, at least in the vertebral row, hemipenes quadrifurcate", despite the fact that she had neither examined any hemipenis of *paucisquamis* or of *taczanowskyi* nor seen one single specimen of either, as she frankly admitted. A later development proved that I was correct in refusing to accept her synoptic key; it came about with the verification I made (16) that the dorsal scales of *paucisquamis* are really carinated. Then I wrote: "In consequence of Miss Stull's revision, quite a few questions concerning either the distinction or the identity of various forms of *Tropidophis* became settled. Unfortunately, a few conclusions stated in her paper strike me as being perhaps a little too hasty, to wit: the extreme subdivision of the species *pardalis*, the description of *wrighti* as a new species based on a single specimen which may as well represent an extreme variation of *pardalis*, and the separation of the continental species *paucisquamis* and *taczanowskyi* into two groups. In her opinion, these groups which bear *maculatus* and *pardalis* as their respective types, might be characterized as follows:

A. Dorsal scales smooth; hemipenes bifurcate — *maculatus* group

AA. Dorsal scales keeled, at least in the vertebral row; hemipenes quadrifurcate — *pardalis* group

"Since Stull wrote in her paper that she had not seen any specimen of either *paucisquamis* or *taczanowskyi*, and since nobody else has ever described the penial character of either species, the separation of these forms in the light of their penis formation appears to be entirely unwarranted. That *paucisquamis* could not be separated from *taczanowskyi* in the light of scale carination I am also quite sure, because I have found that the specimen of *paucisquamis*, now in the collection of the Instituto Butantan, bears keeled scales in the dorsum just as is the case with *taczanowskyi*".

Consequently there remain in Stull's revision but the scale counts to confirm her conclusions on the subdivision of *Tropidophis*. This I have decided, on the knowledge I have of the genus, not to accept, but let it stand the test of time. Before some reviser confirms her findings I feel that I am perfectly justified in the action I took when I omitted Stull's new names from my Check-list of Neotropical Ophidia.

— — — —

BIBLIOGRAPHIA

(REFERENCES)

1. *Stull, O. G.* — Corrections to some recent papers on neotropical snakes — Bull. Antivenin Inst. Amer. V(2):39.1931.
2. *Amaral, A. do* — Valor systematico de varias formas de ophidios neotropicos — Mem. Inst. Butantan IV:3-68.1929.
3. *Amaral, A. do* — Lista remissiva dos ophidios do Brasil. *loc. cit.* IV:69-125.1929.
4. *Amaral, A. do* — Lista remissiva dos ophidios da região neotropica — *loc. cit.* — IV:127-271.1929.
5. *Stull, O. G.* — A revision of the genus *Tropidophis* — O. P. Mus. Zool. Univ. Michigan. 195:1-49.1928.
6. *Meerwarth, H.* — Die westindischen Reptilien und Batrachier des naturhistorischen Museums in Hamburg — Mitteil. Naturh. Mus. Hamburg XVIII(2):5.1901.
7. *Schmidt, K. P.* — The amphibians and reptiles of Mona Island, West Indies — Field Mus. N. H. Publ. 236 Zool. Ser. XII(12):159.1926.
8. *Stejneger, L.* — A new systematic name for the yellow boa of Jamaica — Proc. U. S. Nat. Mus. XXII (1218):469.1901.
9. *Serié, P.* — Sur la distribution géographique des deux expèces de Boas aquatiques *Eunectes murinus* (L.) et *Eunectes notaeus* Cope. — Bull. Soc. Phys. I:443.1914.
10. *Ribeiro, A. de M.* — Sobre a ampliação da area geographica de *Eunectes notaeus* Cope. — Bol. Mus. Nac. Rio I(5):363.1924.

11. *Burt, C. E.* (and *M. D. Burt*) — S. A. lizards in the collection of the American Museum of Natural History — Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. LXI:313.1931.
12. *Amaral, A. do* — Excursão á Ilha da Queimada Grande (notas sobre a biologia de uma Lachesis ali existente) — Comm. Soc. Med. Cir. São Paulo 15. IV.1920.
13. *Amaral, A. do* — Contribuição para o conhecimento dos ofidios do Brasil — Anex. Mem. Inst. Butantan, I(1).1921.
14. *Amaral, A. do* — On the biological differentiation of the neotropical species of snakes, *Bothrops atrox* (Linné, 1758), *B. jararaca* (Wied, 1824) and *B. jararacussu* (Lacerda, 1884) — Amer. J. Trop. Med. IV:447-452.1924.
15. *Cope, E. D.* — The classification of the ophidia — Transact. Amer. Philos. Soc. XVIII. 1895.
16. *Amaral, A. do* — A rare Brazilian snake — Bull. Antivenin Inst. Amer. IV(1):15.1930.

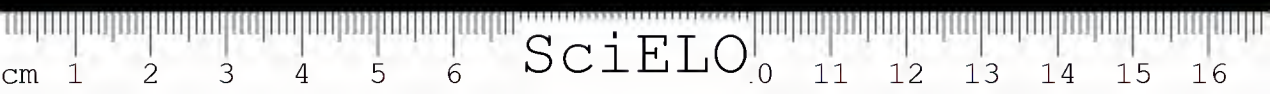
(Trabalho da Secção de Ophiologia do Instituto Butantan, dezembro de 1931.

(From the Ophiological Department of the Instituto Butantan, December, 1931).

CONTRIBUIÇÕES AO CONHECIMENTO DOS CULICIDEOS DE SÃO PAULO

POR

ALCIDES PRADO

595.771

CONTRIBUIÇÕES AO CONHECIMENTO DOS CULICIDEOS DE SÃO PAULO

I. Notas sobre *Mansonia albifera* PRADO e sobre o macho de *Mansonia albicosta* (CHAGAS)

POR

ALCIDES PRADO

Entre os mosquitos capturados em Butantan, durante o mês de março do corrente anno, identifiquei as seguintes especies de *Mansonia*: *Mansonia* (*Rhynchotaenia*), *juxtamansonia* (Chagas), *Mansonia* (*Rhynchotaenia*) *fasciolata* (Lynch Arribalzaga), *Mansonia* (*Mansonia*) *amazonensis* (Theobald) e uma especie que me pareceu nova, para cuja descripção me utilizei de exemplares dos dois sexos. Os criadouros de mosquitos *Mansonia* são provavelmente os charcos das proximidades do rio Pinheiros, em Butantan, onde as plantas aquaticas da familia das *Araceae* existem abundantemente. Segundo Costa Lima, as larvas de *Mansonia* apresentam na extremidade do syphão dois pequenos ganchos moveis, que podem ser introduzidos nas partes submersas das plantas aquaticas: uma vez fixado o syphão, a larva aspira o ar dos canaliculos aeriferos, muito desenvolvidos nestas plantas.

Ao anoitecer, os alados desse genero procuram as habitações proximas ou distantes, onde são facilmente capturados. Em Butantan, as capturas se faziam nas partes teladas das janelas, em casas de empregados do Instituto.

Mansonia (Rhynchotaenia) albifera PRADO

(mosquito novo capturado em Butantan)

Femea — Proboscida longa, negra, com um largo anel branco pouco alem do meio; ponta, com exclusão dos labellos, branca. Palpos curtos, negros, com escamas brancas no apice do ultimo articulo. Antennas mais curtas que a proboscida, negras e pilosas. Toros amarellos, com algumas escamas escuras no

lado interno. Clypeo negro, glabro. Occipicio pardo-escuro, com escamas branco-amarelladas e curvas, em mistura com outras negras e erectas; vertice com um pequeno grupo de escamas branco-amarelladas. Lobos prothoracicos negros, não muito salientes e com algumas escamas branco-amarelladas. Mesonoto pardo-escuro, com escamas pallido-doiradas, na parte anterior; essas escamas se diffundem para os lados na parte mediana; ainda escamas pallido-doiradas em forma de pequenas estrias na parte posterior, alem de estrias iguaes nos lados, onde tambem se notam escamas pardo-escuras. Escutello pardo-escuro, trilobado, com um reduzido numero de escamas pallido-doiradas sobre o lobo medio. Metanoto pardo-escuro e nú. Balancins inteiramente branco-pallidos. Pleuras com duas nitidas separações pardo-escuras e com tufos de escamas brancas. Abdome recoberto de escamas escuras e com cintas basaes brancas, estreitas, alargando-se lateralmente, em todos os segmentos; ventre da mesma côr, com leve faixa branca apicilar dos segmentos. Pernas pardo-escuras; coxas e trochantéres pardo-escuros, com algumas escamas brancas; femores da mesma côr, com um anel branco subapicilar e os apices levemente brancos, possuindo todos, na face interna, uma larga faixa de escamas pallido-esbranquiçadas; tibias pardo-escuras, com os apices ligeiramente brancos e face interna de todas, com uma estreita linha de escamas pallido-esbranquiçadas; tarsos pardo-escuros, com aneis brancos envolvendo ambas as extremidades das juntas. Unhas iguaes e simples. Azas revestidas de escamas escuras, ovaes estreitas, caracteristicas; um pequeno grupo de escamas branco-amarelladas inserido na parte basal da primeira nervura longitudinal; primeira cellula submarginal mais comprida e ligeiramente mais estreita que a segunda posterior; peciolo da primeira cellula pouco menor que a metade do comprimento da cellula; peciolo da segunda cellula cerca de um terço do comprimento da cellula.

Macho — Proboscida longa, negra, com anel branco pouco alem do meio; ponta, com exclusão dos labellos, branca. Palpos longos não excedendo o comprimento da proboscida, negros, com algumas escamas brancas na base; um largo anel branco entre o primeiro e segundo articulos; dois outros menores, da mesma côr, respectivamente, na base do terceiro e quarto articulos. Antennas mais curtas que a proboscida, pardo-amarelladas e com plumas da mesma côr. Clypeo negro, com raras escamas brancas. Occipicio e lobos prothoracicos como na femea. Mesonoto pardo-acastanhado e com ornamentação mais ou menos identica á da femea. Abdome, pernas e azas como na femea.

Hypopygio (Fig. 1) — Peça basilar quasi duas vezes mais longa que larga; lobo basilar pequeno, um tanto arredondado, supporta um espinho muito mais longo que elle; um denso tufo de finas cerdas collocado pouco acima do lobo basilar. Pinça (clasper) larga, deprimida na base, angulosa e com uma ponta portadora de um pequeno dente forte e terminal. Decimos esternitos estreitos, fortemente chitinizados, tendo na extremidade seis dentes dispostos em ordem decrescente. Nonos tergitos acuminados, encerram nove a

dez cerdas. Mesosoma com dois pares de appendices: par interno chitinizado, erecto, expandido na ponta; par externo tambem chitinizado, divergente e ligeiramente triangular.

Comprimento da femea e do macho: 5 mm.

Holotypo e allotypo, femea e macho, se acham na collecção do Instituto Butantan, São Paulo.

Larva — desconhecida.

Mansonia (Rhynchotaenia) albicosta (CHAGAS, in PERYASSÚ, 1908)
(descripção do exemplar macho)

Tive occasião de encontrar numa caixa com insectos, no Instituto Butantan, um exemplar macho de *Mansonia albicosta*. Apenas constava como referencia, que o mesmo fôra capturado em Butantan, no anno de 1918. Exemplar mal conservado, mas integro; delle pude conseguir uma boa preparação do hypopygio, conforme desenho junto, obtido do original, em camara clara. A seguir, passo à descripção summaria do adulto em questão, com seu respectivo hypopygio, visto não ter sido feita, ao que eu saiba, até esta data.

Macho — Proboscida moderada, negra, com um largo anel branco alem do meio; ponta, sem os labellos branca. Palpos longos, excedendo em comprimento a proboscida, pardos, com poucas escamas brancas na base; um largo anel branco entre o primeiro e segundo articulos; aneis brancos menores, respectivamente, na base dos dois ultimos articulos. Occipicio negro, com escamas brancas e curvas e outras negras e erectas. Mesonoto pardo-escuro, com escamas pallido-doiradas formando tres faixas, uma longitudinal mediana e duas parallelas lateraes; faixa mediana larga e as lateraes apenas constituidas por escamas mais ou menos esparsas. Abdome pardo-escuro, com leves manchas de escamas brancas, nas partes latero-basaes dos segmentos; ventre com escamas pardo-escuras e um pequeno grupo de escamas brancas na parte media dos segmentos. Pernas negras; femores da mesma côr, com um estreito anel branco subapicilar; tibias manchadas de branco, formando no par posterior, lado interno, uma linha da mesma côr; tarsos com aneis brancos envolvendo ambas as extremidades das juntas. Azas com escamas escuras, ovaes estreitas, caracteristicas; primeira nervura longitudinal com uma fileira de escamas branco-amarelladas em todo o quarto basilar; primeira cellula submarginal mais comprida e ligeiramente mais estreita que a segunda posterior.

Hypopygio (Fig. 2) — Peça basilar mais ou menos longa e arredondada no apice; lobo basilar curto, um tanto conico, supporta um espinho muito mais longo que elle e apparentemente curvo. Pinça (clasper) grande, delgada na sua metade basilar e entumecida na outra, onde se notam raros pêlos; um dente terminal alongado e forte. Decimos esternitos estreitos, chitinizados, com

cinco dentes divergentes na extremidade. Nonos tergitos acuminados, com cerca de nove a dez cerdas. Mesosoma com dois pares de appendices: o interno em columna, erecto, expandido na ponta, onde tambem se observa uma serie de denticulos; o externo, divergente, curto e curvo.

Larva — desconhecida.

RESUMO E COMMENTARIOS

Os exemplares que serviram para a descripção de *M. albifera*, foram capturados em Butantan, durante o mês de março do corrente anno.

Essa especie é affim de *Mansonia albicosta* (Chagas), distinguindo-se desta ultima pelos caracteres especificos seguintes: côr geral das tibias, naquella — pardo-escura, nesta — manchada de branco; coloração das azas: naquella — um pequeno grupo de escamas branco-amarelladas na base da primeira nervura longitudinal, nesta — uma fileira de escamas da mesma côr, occupando mais ou menos o quarto basilar da nervura.

Differe de *M. chrysonotum* (Peryassú), considerada proxima de *M. albicosta*, pela coloração do mesonoto. Em *M. chrysonotum* as escamas doiradas do mesonoto formam tres largas faixas medianas e parallelas, unidas, que se extendem desde a parte anterior do mesonoto até pouco além do meio; na metade posterior as escamas doiradas formam manchas em continuação ás faixas anteriores ou adiante da raiz das azas; lateralmente e posteriormente escamas escuras. Em *M. albifera* as escamas pallido-doiradas da parte anterior do mesonoto, apenas se diffundem para os lados na parte mediana; pequenas estrias de escamas da mesma côr nas partes lateraes e posteriores, alem de escamas pardo-escuras lateraes.

Distingue-se de *M. juxtamansonia* (Chagas), pelo mesonoto que, nesta especie, é constituido por escamas pallido-doiradas distribuidas em estreitas linhas longitudinaes; pelas tibias que nesta especie, ao contrario de *albifera*, são manchadas de branco, com uma linha da mesma côr no lado interno do par posterior; ainda pela coloração das azas que nesta especie é caracterizada pela presença de escamas ovaes estreitas, brancas e pretas misturadas.

Finalmente, *M. albifera* não poderá confundir-se com *M. fasciolata* (Lynch Arrib.), pela ornamentação de mesonoto que é um pouco differente, como especialmente pela côr das tibias. Enquanto que as tibias de *M. albifera*, com excepção dos apices, são pardo-escuras, as de *M. fasciolata* são salpicadas de branco.

O hypopygio de *albifera* tem caracteres firmes e typicos, o que dispensa qualquer comparação.

Quanto á *M. albicosta*, o macho desta especie parece muito identico á femea respectiva, descripta por Chagas. O exemplar que serviu para a presente descripção foi encontrado por mim em uma caixa com insectos, no Instituto Bu-

tantan, apenas constando ter sido o mesmo capturado no proprio Butantan, no anno de 1918.

O hypopygio de *albicosta* parece tambem bastante caracteristico, não se confundindo com o de outras especies consideradas proximas e pertencentes ao mesmo subgenero.

ABSTRACT

Mansonia albifera Prado seems to be closest to *M. albicosta* (Chagas), *M. chrysonotum* (Peryassú), *M. juxtamansonia* (Chagas) and *M. fasciolata* (Lynch Arrib.), from all of which it can be easily separated by the hypopygium characters, besides some other points discussed in the text.

Mansonia albicosta (Chagas) seemed to be known thus far only from the female so that the male is described and its hypopygium represented for the first time, showing this species to be easily distinguishable from all of those included in the same subgenus.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Theobald, F. V.* — A monograph of the Culicidae, III.1903.
2. *Blanchard, R.* — Les Moustiques. 1905.
3. *Peryassú, A.* — Os Culicideos do Brasil. Rio, 1908.
4. *Peryassú, A.* — Uma nova especie de Culicideo brasileiro — Folha Medica III(15): 117.1922.
5. *Bequaert, J.* — Hamilton Rice Seventh Expedition to the Amazon, in conjunction with the Dep. of Trop. Med. at Harvard University. 1924-1925.
6. *Bonne & Bonne* — Mosq. of Surinam, Royal Col. Inst. of Amsterdam. 1925.
7. *Shannon, R. C. & Del Ponte, E.* — Los Culic. en la Argentina — Rev. Inst. Bact. V(1):29.1927.
8. *Dyar, H. G.* — The Mosquitoes of the Americas. 1928.
9. *Matheson, R. A.* — A Handbook of the North America 1929.
10. *Lima, A. da Costa* — Sobre algumas especies de Mansonia encontradas no Brasil — Mem. Inst. Oswaldo Cruz XXII:297.1929.
11. *Lima, A. da Costa* — Sobre a revalidação do genero Taeniorhynchus — Mem. Inst Oswaldo Cruz XXIII(2):105.1930.
12. *Edwards, F. W.* — Mosq. notes. X — Bull. Entom. Res. XI(4):541.1931.
13. *Martini, E.*—Ueber einige suedamerikanische Culiciden — Rev. de Entom. I(2):199.1931.

(Trabalho da Secção de Protozoologia e Parasitologia do Instituto Butantan, agosto de 1931).

1

Fig. 1

Hypopygio de M. albifera Prado

2

Fig. 2

Hypopygio de M. albicosta (Chagas)

593.771

CONTRIBUIÇÕES AO CONHECIMENTO DOS CULICIDEOS DE SÃO PAULO

II. Notas sobre as especies encontradas nos arredores da capital e sobre a determinação de *Aëdes crinifer* (THEOB.)

POR

ALCIDES PRADO

A partir do verão do anno passado, iniciei uma serie de pesquisas para o estudo das especies de mosquitos existentes nos arredores de São Paulo. Estendi esses trabalhos aos bairros do Jardim America, Jardim Europa, Itahim, Cidade Jardim, Varzea do Tieté, Casa Verde, Pinheiros e Butantan. Si mais dilatada fosse a area percorrida e mais frequentes essas pesquisas, certamente a lista de Culicideos, que ora apresento, estaria grandemente augmentada. Entretanto, quer de exemplares obtidos de larvas, quer dos obtidos por meio de capturas, as especies discriminadas são, em sua maioria, interessantes e raras, razão pela qual não me arrependo do tempo gasto neste mister.

Varios entomologos têm-se occupado da distribuição dos mosquitos em São Paulo, a começar por Lutz, que apresenta valiosa contribuição, conforme se lê em Peryassú. As larvas, grandes de preferencia, trazidas ao laboratorio, foram separadas por mim, em boccaes de vidro, contendo geralmente agua do proprio fóco. Depois da primeira metamorphose as exuvias respectivas eram montadas; algumas vezes o mesmo se fazia em relação ás exuvias nymphaes. Após a emergencia dos adultos, eram elles fixados em alfinetes entomologicos, debaixo para cima, entre os pares de patas e em seguida collocados em vidros apropriados, numerados e fichados. Os hypopygios, da mesma forma, foram convenientemente preparados e colleccionados.

Adoptando tal criterio, pude determinar as seguintes especies de mosquitos, em São Paulo:

Dos mosquitos domesticos, nas aguas estagnadas impuras, em vallas e valletas, depressões de terreno, recipientes diversos, as larvas mais communs eram

as de *Culex* (*Culex*) *quinquefasciatus* Say e *Culex* (*Culex*) *coronator* Dyar & Knab; em aguas da mesma natureza, somente em um ou outro fóco, em zona povoada, me foi dada occasião de encontrar o *Aëdes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus). Influencias sazonaes e outras, elevam de muito pouco o numero dos fócos dos mosquitos dessa ultima especie em São Paulo. Antes mesmo da organização actual do serviço de policia de fócos, notára que mesmo em bairros de população densa, em pleno verão, o indice estegomico não excedia nunca de 2 %, na capital.

Adultos das duas primeiras especies citadas, em certos bairros, predominaram sempre dentro das habitações, sendo conhecidas como as mais importunas.

Especies silvestres, algumas das quaes tambem importunas, predominaram nos bairros ou areas afastadas da cidade. As larvas desses mosquitos abundaram nas aguas temporarias das depressões de terreno, aguas de fonte, charcos com vegetação aquatica: *Uranotaenia geometrica* (Theobald), *Uranotaenia pulcherrima* Lynch Arribalzaga, este ultimo assignalado num fóco da Cidade Jardim, nas proximidades do rio Pinheiros; *Lutzia bigoti* (Bellardi) e *Lutzia brasiliae* Dyar, ambos igualmente communs em São Paulo: *Psorophora* (*Psorophora*) *cilipes* (Fabricius), *Psorophora* (*Psorophora*) *ciliata* (Fabricius), *Psorophora* (*Janthinosoma*) *discrucians* (Walker), *Psorophora* (*Janthinosoma*) *ferox* (Humboldt), *Psorophora* (*Janthinosoma*) *lutzii* (Theobald), *Psorophora* (*Janthinosoma*) *cyanescens* (Coquillett), sendo alguns adultos dessas especies capturados no horto e na mata em Butantan; *Aëdes* (*Ochlerotatus*) *serratus* (Theobald), *Aëdes* (*Ochlerotatus*) *scapularis* (Rondani), *Aëdes* (*Ochlerotatus*) *crinifer* (Theobald), especies quasi sempre obtidas em fócos temporarios (aguas de chuva), muito disseminadas; *Mansonia* (*Mansonia*) *amazonensis* (Theobald), *Mansonia* (*Mansonia*) *titillans* (Walker), *Mansonia* (*Mansonia*) *pseudotitillans* (Theobald), *Mansonia* (*Rhynchotaenia*) *juxtamansonia* (Chagas), *Mansonia* (*Rhynchotaenia*) *fasciolata* (Lynch Arribalzaga), *Mansonia* (*Rhynchotaenia*) *albifera* Prado, adultos quasi sempre capturados ao anoitecer, na parte exterior telada das janelas, em casas de empregados em Butantan. Obtive innumeros exemplares de algumas das citadas especies, especialmente nos meses de abril e maio deste anno, após as grandes chuvas do verão. Acredito que esses mosquitos sejam provenientes dos grandes charcos marginaes ao rio Pinheiros, onde existe uma vegetação aquatica muito rica. Entre os anophelineos, citarei as seguintes especies: *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *argyritarsis* Robineau-Desvoidy, *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *tarsimaculatus* Goeldi, *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* (Lynch Arribalzaga), *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *evansi* (Brethés), *Anopheles* (*Anopheles*) *maculipes* (Theobald), sendo das mais frequentes a especie *A. evansi*. *Chagasia fajardoi* (Lutz) existe na mata em Butantan, onde foi capturada no outomno. Das especies bromelicolas, quasi todas obtidas de larvas colhidas em bromelias, na mata, em Butantan, mencionarei: *Wyeomyia* (*Wyeomyia*) *longirostris* Theobald, *Wyeomyia* (*Dyarina*) *tripartita* Bonne-

Wepster & Bonne, *Myamyia* (*Cleobonnea*) *negrensis* (Gordon & Evans), *Megarhinus* (*Ankylorhynchus*) *trichopygus* (Wiedmann), *Isostomyia paranensis* (Brethés), *Sabethes remipusculus* Dyar e *Culex* (*Microculex*) *imitator* Theobald.

As larvas das especies bromelicolas, geralmente vivem longo tempo no laboratorio, em agua do proprio fóco, não renovada. Nessas condições difficilmente morrem. Sua metamorphose se dá lentamente, mesmo com farta alimentação e temperatura favoravel.

Depois da determinação que acabo de fazer das especies de mosquitos dos arredores da capital e de estudar certos factos relativos á biologia de algumas das especies enumeradas, quero referir-me ás especies de *Aëdes* mais frequentes em São Paulo e das mais importantes sob o ponto de vista epidemiologico: *A. scapularis*, *A. serratus* e *A. crinifer*. Martini, em um dos seus ultimos trabalhos, estuda o *A. scapularis* e o *A. serratus*, acompanhados de desenhos dos respectivos hypopygios, não deixa duvida quanto á sua identificação, porém nada referindo sobre *A. crinifer*, cuja determinação, a não ser pelos caracteres geraes do adulto, ainda me parece um tanto confusa e incerta. Para estudar comparativamente as tres especies, começo por reproduzir adiante a microphotographia do hypopygio de *A. serratus* (Fig. 3), perfeitamente individualizada por Dyar e Martini. A seguir, a microphotographia do hypopygio de *A. scapularis* (Fig. 4), cujo desenho no trabalho de Martini é perfeito, mas que na monographia de Dyar presumo não o seja. As microphotographias que se seguem são do hypopygio de *A. crinifer* (Fig. 5) e larva da mesma especie (Fig. 6). Tenho a impressão de que, na monographia de Dyar, o desenho do hypopygio de *A. crinifer* deve pertencer a *A. scapularis*. A especie *A. crinifer* descripta por Theobald em 1903, de dois exemplares que lhe foram enviados de São Paulo, por Lutz, é facilmente reconhecivel pela sua ornamentação thoracica. Quanto á larva, creio apenas existir uma microphotographia, essa devida a Peryassú e estampada em seu livro, em 1908. Dessa maneira pelos caracteres do hypopygio e da larva me foi difficil determinar os primeiros exemplares da referida especie.

Faço, em seguida, um resumo dos caracteres especificos de *A. crinifer*, baseado em varias preparações montadas do hypopygio e larva.

Hypopygio de A. crinifer — Peça lateral longa e estreita, levemente arredondada no apice; lobo apicilar redondo, saliente, continuando em baixo até formar o lobo basilar, igualmente saliente, acuminado e com pequenas cerdas inseridas sobre grandes tuberculos; uma grande e espessa espinha adjacente. Pinceta (claspette), com uma longa haste levemente incurvada e entumecida na ponta; filamento longo, dobrado em angulo ao meio, para terminar em ponta, tendo um entalhe inferior muito pronunciado, onde se notam alguns dentes recurvados. Pinça (clasper) longa, afilada na extremidade e com espinho alongado e fino. Decimos esternitos moderados, fortemente chitinizados e espessos na ponta, onde, em cada um, ha um dente apparentemente voltado para os lados. Nonos tergitos

pequenos, quadrados, com quatro espinhos. Mesosoma cylindro-conico e com uma pequena abertura no apice.

Larva de A. crinifer — Cabeça arredondada e enfunada dos lados, cerdas superiores da cabeça multiplas, em numero de cinco; cerdas inferiores tambem multiplas, em numero de tres. Tufo ante-antennal multiplo. Antenna moderada, delgada, com um pequeno tufo antes do meio. Pente lateral do oitavo segmento, com numerosas escamas, em mancha triangular e em numero de vinte e duas ou mais; algumas dessas escamas apresentam ponta espessa, aguda; outras com pontas rectas ou ligeiramente curvas, ornadas todas de espinhas lateraes muito delicadas. Tubo aereo (syphão respiratorio) curto e duas vezes mais comprido que largo; pente excedendo o meio do tubo e seguido de um tufo multiplo; dorsalmente, com tres pares de tufos, de cada lado. Segmento anal cercado por uma placa chitinosa e com uma escova ventral posterior. Tufo dorsal acompanhado de uma longa cerda de cada lado; cerda lateral simples, pequena. Branchias anaes muito longas, levemente sinuosas, finas e pontudas.

RESUMO

Iniciando, a partir do verão do anno passado, uma serie de pesquisas para o estudo dos mosquitos dos arredores de São Paulo, pude determinar a presença de varios culicideos, alguns dos quaes interessantes e raros.

Depois de estudar ligeiramente factos relativos á biologia de algumas das especies citadas, quiz referir-me á determinação de *Aëdes scapularis, A. serratus* e *A. crinifer,* muito disseminadas e importantes, sob o ponto de vista epidemiologico.

Quanto a *A. crinifer,* cuja determinação pelos caracteres especificos do macho e larva me parece ainda um tanto confusa e incerta, procurei esclarecimentos nas preparações montadas do hypopygio e exuvia larval desta especie.

ABSTRACT

In the course of a revisionary study of the mosquitoes found in the suburbs of São Paulo several specimens of Culicidae were encountered some of which proved to be especially interesting. Besides many other species the biology of which is discussed in the text, *Aëdes scapularis, A. serratus* and *A. crinifer* were particularly scrutinized due to their epidemiological importance.

A. crinifer, the status of which seemed to be in a rather confusing and uncertain condition, was closely investigated in the light of its hypopygial and larval characters which leave no doubt as to its validity.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Theobald, F. V.* — A monograph of the Culicidae, III. 1903.
2. *Peryassú, A. G.* — Os Culicideos do Brasil, Rio, 1908.
3. *Bonne, C. & Bonne-Wepster* — Mosquitoes of Surinam. 1925.
4. *Dyar, H. G.* — The Mosquitoes of the Americas. 1928.
5. *Pinto, C.* — Mosquitos da região neotropica — Mem. Inst. Oswaldo Cruz XXIII(3): 153.1930.
6. *Shannon, R. C.* — Relatorio de uma inspecção de mosquitos na cidade de Bomfim, Bahia. Saneamento. 8(11)1930.
7. *Shannon, R. C.* — Relatorio de uma rapida investigação de mosquitos em Recife, Saneamento. 8(12).1930.
8. *Martini, E.* — Ueber einige südamerikanische Culiciden. Rev. de Entom. I(2):199.1931

(Trabalho da Secção de Protozoologia e Parasitologia do Instituto de Butantan, outubro de 1931).

Fig. 3

Hypopyglo de *A. serratus*

Fig. 4

Hypopyglo de *A. scapularis*

Fig. 5

Hypopyglo de *A. crinifer*

Fig. 6

Larva de *A. crinifer*

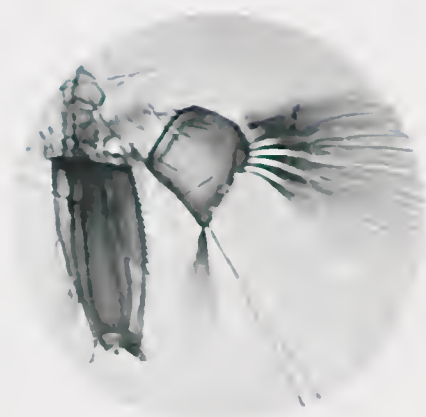



Fig. 7

Larva de *A. crinifer*

595.771

CONTRIBUIÇÕES AO CONHECIMENTO DOS CULICIDEOS DE SÃO PAULO

III. Notas sobre *Psorophora (Janthinosoma) discrucians* (Walker) e descripção do exemplar macho.

POR

ALCIDES PRADO

No decurso do mês de dezembro ultimo, pude, com o auxilio dos srs. Arnaldo França e Edison A. Dias, capturar, em Butantan, numerosos adultos da especie cujo nome encima estas notas. Durante dias consecutivos, em capturas diurnas e nocturnas, collectaram-se algumas dezenas de mosquitos dessa especie, com a presença apenas de um macho, que serviu de base para esta descripção.

Até á presente data, parece-me não ter sido descripto o macho de *Ps. discrucians*, segundo bibliographia que consultei, restando, porém, desconhecida a larva respectiva.

Psorophora (Janthinosoma) discrucians (Walker)

Macho — Proboscida delgada, negra, com reflexos purpurinos. Palpos mais longos que a proboscida, negros, com reflexos egualmente purpurinos e com a extremidade voltada para cima; porção apicilar do penultimo e ultimo articulos com pêlos innumeros. Antennas escuras, longo-plumosas. Toros negros, brilhantes e inteiramente nús. Occipicio todo revestido de escamas amarello-acobreadas. Mesonoto negro, brilhante, com escamas curvas pardo-bronzeadas ao meio; escamas fusiformes, amarello-doiradas lateralmente. Escutello negro, brilhante e com algumas escamas fusiformes amarello-doiradas; algumas cerdas apenas sobre os lobos. Pleuras e coxas com escamas amarello-esbranquiçadas. Abdome escuro, purpurino, com manchas branco-amarelladas na parte lateral dos segmentos; ventre da mesma côr, com os apices de todos os segmentos branco-amarellados.

Pernas escuras, com brilho purpurino; femores com raras escamas branco-cinzas na ponta; quarto articulo tarsal do par posterior branco nos seus 2/3 basilares.

Azas ennegrecidas, com escamas estreitas e escuras; primeira cellula submarginal pouco mais comprida, porem muito mais estreita que a segunda posterior; peciolo da primeira cellula pouco mais da metade do comprimento da cellula; nervura transversal media muito proxima da nervura transversal posterior.

Hypopygio (Est., fig. 1) — Peça lateral mais ou menos cylindrica, com a junta truncada, pilosa. Pinceta (claspette) delgada, fortemente curva com uma expansão sub-apicilar em sua face interna, constituida por cerca de nove cerdas rectilineas; ponta com tres visiveis appendices: um externo, espesso e curvo e dois internos, sendo o primeiro anelado e membranoso e o segundo em forma de foliolo. Pinça (clasper) entumecido, estreito na base e no apice, terminando com um espinho alongado. Decimos esternitos fortemente chitinizados, estreitos; ponta espessa onde se contam cerca de quatro denticulos. Nonos tergitos reduzidos. Mesosoma cylindrico, ligeiramente estreito, exteriormente.

O hypopygio differe pouco de *ferox*, *lutzii* e *champerico*, assignalados os tres na monographia de Dyar, 1928.

Comprimento — 6mm.50.

Larva — desconhecida.

RESUMO E COMMENTARIOS

Neste trabalho limito-me a descrever o macho de *Ps. discrucians*, capturado em Butantan. A descripção que ora faço do adulto é summaria, pois elle apresenta o colorido geral da femea já descripta. Differencia-se de *Psorophora varipes* (Coquillett), especie norte-americana, por não possuir de côr branco-prateada as pontas dos femores posteriores. Pelo exame do hypopygio esta differença com *Ps. varipes* é ainda mais evidente.

O hypopygio de *Ps. discrucians*, ao meu ver, differe de *ferox*, *lutzii* e *champerico* apenas pelos appendices da ponta da pinceta. Em *Ps. discrucians* são tres os appendices: um externo, espesso e curvo e dois internos, sendo um anelado e membranoso e outro em forma de foliolo; em *Ps. ferox*, *Ps. lutzii* e *Ps. champerico*, segundo os desenhos publicados por Dyar, são apenas dois esses appendices: um externo, espesso e curvo e outro interno anelado e membranoso.

ABSTRACT

A male specimen of *Psorophora discrucians*, captured at Butantan, is described and its hypopygium represented in the text so as to show its differentation from *Ps. varipes*, *lutzii* and *champerico*.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Blanchard, R.* — Les moustiques: 232-253.1905.
2. *Theobald, F. V.* — A monograph of the Culicidae V:121.1911.
3. *Peryassú, A. G.* — Folha Medica IV:70.1923.
4. *Dyar, H. G.* — The mosq. of the Americas: 120.1928.

(Trabalho da Secção de Protozoologia e Parasitologia do Instituto Butantan, dezembro de 1931).

595.771

CONTRIBUIÇÕES AO CONHECIMENTO DOS CULICIDEOS DE SÃO PAULO

IV. Uma nova especie de *Uranotaenia* (Diptera, Culicidae)

POR

ALCIDES PRADO

Em julho deste anno, quando muito reduzida era a densidade dos mosquitos adultos, pude, auxiliado pelo sr. Domingos Yered, capturar nas matas de Butantan, alguns exemplares de *Chagasia fajardoi* (Lutz) e uma femea e dois machos de uma especie nova de *Uranotaenia*, cuja descripção constitue o objecto deste estudo. No mesmo local, em differentes estações do anno, reuni interessantes especimes da fauna culicidica, inclusive *Aëdes*, que têm grande importancia epidemiologica na febre amarella.

Dessa forma, com material proveniente em grande parte dos arredores desta capital, consegui iniciar o trabalho de reorganização da collecção entomologica do Instituto.

Uranotaenia ditaenionota, sp. n.

Femea — Proboscida longa, pardo-escura; ponta entumecida da mesma côr. Palpos curtos, inteiramente pardo-escuros. Antennas pilosas, pardas; toros pardo-amarellados, nús. Clypeo pardo-escuro, glabro. Occipicio revestido de escamas chatas, negras; outras erectas e bifurcadas da mesma côr, esparsas; larga faixa de escamas chatas, pallido-azuladas, delimitando os olhos, do vertice adiante, e, de cada lado, seguindo em direcção aos lobos prothoracicos. Lobos prothoracicos pouco salientes, pardo-escuros, com uma mancha constituida de escamas pallido-azuladas. Mesonoto pardo-escuro e com escamas estreitas, delgadas, quasi rectas, levemente acobreadas e disseminadas; larga faixa de escamas chatas, pallido-azuladas, desde o angulo anterior á base da aza, em ambos os lados; pleuras pardo-amarelladas; cada uma com nitida separação

pardo-escura, apparecendo, ao centro, uma mancha de escamas chatas, pallido-azuladas. Escutello visivelmente trilobado, pardo-amarellado, brilhante, com escamas chatas da mesma côr, especialmente sobre o lobo medio e com tres cerdas marginaes sobre cada um dos lobos. Metanoto pardo-escuro e completamente nú. Balancins pardo-escuros, com os capitulos de tonalidade mais carregada do que os pedunculos respectivos. Abdome quasi negro e com brilho metallico, devido ao seu revestimento de escamas chatas e negras, com excepção da base de todos os segmentos, esta com uma larga faixa de escamas chatas e de côr branco-perola; ventre pardo-amarellado e sensivelmente mais claro que o dorso. Pernas negras, de brilho metallico; coxas e trochanteres amarello-pallidos; parte inferior dos femores amarello-desmaiado; par posterior com a metade apicilar do 3.°, todo o 4.° e 5.° articulos inteiramente brancos; juntas articulares branco-pallidas. Unhas eguaes, delgadas e simples. Azas membranosas, sem villosidades, com escamas lanceoladas longas, pardo-claras, em toda a porção apicilar da 1.ª, 2.ª e 4.ª nervura longitudinaes e ao longo da 3.ª; escamas espatuladas curtas, escuras, em toda porção basilar da 1.ª, 2.ª, e 4.ª nervuras longitudinaes e ao longo das demais nervuras; 1.ª cellula submarginal pouco menor e mais estreita do que a 2.ª posterior; peciolo da 1.ª cellula quasi duas vezes mais comprido do que a cellula; peciolo da 2.ª cellula uma e meia vez mais comprido do que a cellula; nervura transversal supranumeraria formando com a transversal media um angulo obtuso; nervura transversal posterior distante da transversal media duas vezes seu comprimento; nervura anal não ultrapassando a forquilha do cubito.

Macho — Proboscida longa, pardo-escura; ponta entumecida da mesma côr. Palpos muito curtos, inteiramente pardo-escuros. Antennas plumosas, pardas; toros pardo-amarellados, nús. Clypeo pardo-escuro, nú. Occipicio revestido de escamas chatas negras; outras erectas e bifurcadas da mesma côr, esparsas; larga faixa de escamas chatas, pallido-azuladas, delimitando os olhos, do vertice adiante, e, de cada lado, seguindo em direcção aos lobos prothoracicos. Lobos prothoracicos pouco salientes, pardo-escuros, com uma mancha formada de escamas pallido-azuladas. Mesonoto pardo-escuro e com ornamentação identica á da femea. Abdome, pernas e azas como na femea.

Hypopygio — Peça lateral curta e um tanto conica; lado basilar projectado lateralmente, acuminado e com a inserção de algumas cerdas longas. Pinça (clasper) forte, excavada na ponta e com um espinho curvo, terminal. Ramo divergente longo, espesso e denticulado. Mesosoma com suas placas lateraes separadas; par interno (cada placa elevada em columna espessa) tendo a formação de tres dentes muito curvos para o lado de fóra; par externo (cada placa pouco elevada) tendo dois dentes em forma de bico de passaro, igualmente voltados para o lado de fóra (Est., fig. 2).

Comprimento da femea e do macho: 4 mm.

Larva — Desconhecida.

Holotypo e allotypo, femea e macho, montados e conservados em vidros, respectivamente, sob os n^{os}. 175 e 176, na collecção do Instituto Butantan, São Paulo. Paratypo, macho, conservado em vidro, sob o n.° 177 e o hypopygio montado do allotypo, em lamina, sob n. 176, na mesma collecção.

COMMENTARIOS

Pela configuração exterior do adulto, *Uranotaenia ditaenionota*, n. sp. parece affim de *Uranotaenia lowii* Theobald e de *Uranotaenia calosomata* Dyar & Knab, ambas encontradas no Brasil. Embora o revestimento externo de *Uranotaenia lowii* seja mais ou menos semelhante ao de *Uranotaenia ditaenionota*, ha a distinguil-a o colorido do mesonoto. O mesonoto de *Uranotaenia lowii* é pardo-acastanhado, brilhante, com uma lista negra central; uma mancha da mesma côr adiante da base da aza, com um centro de escamas chatas, azul-prateadas, em ambos os lados. O mesonoto de *Uranotaenia ditaenionota* é, entretanto, pardo-escuro, com escamas estreitas, delgadas, quasi rectas, levemente acobreadas e disseminadas; larga faixa de escamas chatas, pallido-azuladas, vae desde o angulo anterior do mesonoto á base da aza, em ambos os lados.

Uranotaenia calosomata, alem de outros caracteres differenciaes especificos, tem seu mesonoto pardo-escuro, com uma estreita linha de escamas chatas e brancas, que vae desde o angulo anterior á base da aza, em ambos os lados, o que certamente diverge, pelo colorido, de *Uranotaenia ditaenionota*. Ainda, o abdome de *Uranotaenia calosomata* que é negro, apresenta uma larga faixa apicilar de escamas chatas, branco-amarelladas, em todos os segmentos, emquanto em *Uranotaenia ditaenionota* ha uma larga faixa basilar de escamas chatas e de côr branco-perola, em todos os segmentos. Os caracteres especificos do hypopygio de *Uranotaenia ditaenionota* são de tal forma evidentes, que dispensam confronto com os existentes nas especies proximas, citadas.

RESUMO

Neste trabalho, utilizando-me de exemplares dos dois sexos, descrevo uma especie nova de *Uranotaenia*, capturada nas matas de Butantan, durante o mês de julho do corrente anno, conjunctamente com alguns exemplares de *Chagasia fajardoi* (Lutz).

Uranotaenia ditaenionota, sp. n., affim de *Uranotaenia lowii* Theobald e de *Uranotaenia calosomata* Dyar & Knab, ambas encontradas no Brasil, differe destas ultimas, pelo revestimento exterior do adulto, como tambem pelos caracteres especificos do hypopygio.

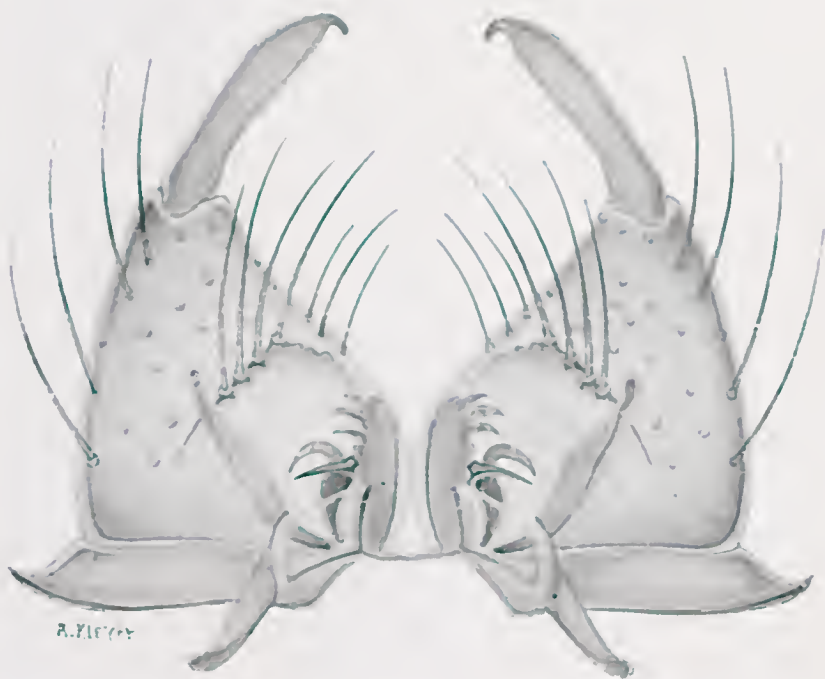
ABSTRACT

A new species of *Uranotaenia* is described as based on specimens of both sexes captured, together with some specimens of *Chagasia fajardoi* (Lutz), in the woods of the Instituto Butantan last July. *Uranotaenia ditaenionota*, sp. n. is closely allied to *Uranotaenia lowii* Theobald and *Uranotaenia calosomata* Dyar & Knab, both also from Brazil and from which it differs especially in the external covering of the adult and in the characteristics of its hypopygium.

(Trabalho da Secção de Protozoologia e Parasitologia do Instituto Butantan, dezembro de 1931).

O trabalho I desta série foi publicado in Ann. Paul. Med. Cir. XXIII (5): 317.1932, tendo sido os de ns. I, II e III apresentados á Semana de Laboratorio (Soc. Med. & Cirurgia. São Paulo), janeiro de 1932.

Mem. Inst. Butantan
Vol. VI, 1931

Hypopygio de P. discrucians (Walker)

Hypopygio de Uranotaenia ditaenionota, n. sp.

PESQUISAS SOBRE TRYPANOSOMAS

POR

J. B. ARANTES E FLAVIO DA FONSECA

593.16:616.961

PESQUISAS SOBRE TRYPANOSOMAS

I. *Trypanosoma butantanense*, sp. n., parasita da serpente *Ophis merremii* WAGLER, 1824

POR

J. B. ARANTES E FLAVIO DA FONSECA

Entre muitas dezenas de exemplares de *Ophis merremii* Wagler, 1824, de proveniencia diversa, cujo sangue peripherico foi examinado, tivemos opportunidade de encontrar em alguns duas especies diversas de *Trypanosoma*.

Uma das especies, *Trypanosoma merremii*, constitue objecto de uma outra nota. No presente trabalho occupar-nos-emos do *Trypanosoma butantanense*, sp. n., o qual foi objecto de estudo mais acurado, aliás ainda em andamento.

Trypanosoma butantanense, encontrado por 4 vezes em infecção natural e pura, differe totalmente da outra especie de *Trypanosoma* que occorre em *Ophis merremii*, pois trata-se aqui de uma especie menor, dotada de grande polymorphismo, multiplicando-se activamente no sangue peripherico, onde é encontrado em grande abundancia em infecção natural e em numero ainda maior em certos casos de infecção experimental, onde o seu numero chega a ser superior ao de globulos vermelhos (Est. II, fig. 18, photographia de preparado obtido de serpente viva), divergindo ainda pela enorme mobilidade de que é dotado. Esses caracteres differenciaes, alem de outros de menor importancia, bem como o facto de serem os dois *Trypanosomas* encontrados em estado de pureza, serviram de base á distincção que estabelecemos, embora occorram na mesma especie de ophidio.

MORPHOLOGIA

EXAME A FRESCO — *Trypanosoma butantanense* apresenta grande mobilidade, quando visto a fresco, sendo mais moveis as formas do typo I. Alem do movimento de propulsão observa-se tambem, nas formas longas, movimento retrogrado, quando encontrado algum obstaculo.

Tambem se observam a fresco formas de reproducção, assistindo-se com frequencia os esforços levados a effeito para terminar a separação dos elementos em phase final de divisão.

Exame após coloração — O estudo comparado das 4 amostras desta especie de *Trypanosoma*, feito em laminas de sangue obtido, quer dos exemplares naturalmente infectados, quer de outros ophidios inoculados, permitte distinguir um certo numero de typos, dos quaes nos occuparemos separadamente.

A distincção destes typos foi baseada apenas em exemplares adultos, i. é, apresentando já a morphologia perfeita dos representantes do genero, não sendo tomada em consideração a morphologia variada de exemplares em phase de divisão ou em phases atrazadas de desenvolvimento, como a phase de crithidia, leptomonas e outras, que tambem são observadas no sangue peripherico de cobras vivas. E' possivel que os tres typos morphologicamente distinctos que descrevemos constituam algumas phases de evolução do typo mais adiantado.

TYPO I

ESTAMPA I

Neste typo foram incluidas as formas apparentemente mais adiantadas, caracterizadas pelo maior comprimento do corpo, que se apresenta naturalmente alongado, perdendo em largura o que ganha em comprimento, com nucleo pequeno muito mais proximo da extremidade anterior do que da posterior, cinetoplasta muito volumoso, occupando toda a largura do Trypanosoma e tambem muito afastado da extremidade posterior; a porção posterior ao cinetoplasta apresenta-se espiralada. O corpo apresenta numerosas granulações azuladas em toda a porção situada adiante do cinetoplasta. A coloração é violeta pallida. O nucleo é avermelhado e o cinetoplasta vermelho carregado. A membrana nitida, muito estreita, e pouco sinuosa acompanha um dos bordos do corpo desde o cinetoplasta até a extremidade anterior (fig. 1).

Foram medidos 3 exemplares:

DIMENSÕES

		Media	*Maxima*	*Minima*
Comprimento total excluido o flagello		45.9	48.5	44.6
Largura ao nivel do nucleo		2.4	2.6	2.1
Distancia do cinetoplasta á extremidade posterior		17.5	17.5	17.5
Nucleo	Comprimento	2.4	2.6	2.1
	Largura	1.0	1.0	1.0
Cinetoplasta	Comprimento	1.3	1.3	1.3
	Largura	0.4	0.4	0.4
Flagello livre		8.1	8.75	7.0

TYPO II

A este typo correspondem os exemplares adultos de tamanho medio, differindo dos do typo I não só por esse caracter, como tambem pela largura maior do corpo ao nivel do nucleo, pelo menor comprimento relativo da zona posterior ao cinetoplasta, que é espiralada, presença de grande numero de granulações nessa porção do corpo, menor comprimento do flagello livre e dimensões relativamente maiores do cinetoplasta, maior largura do nucleo e situação mais central do nucleo em relação ao comprimento do flagellado (Fig. 2).

DIMENSÕES

As medidas de 3 exemplares deram os seguintes resultados:

		Media	*Maxima*	*Minima*
Comprimento total excluido o flagello		21,9	23,1	20,5
Largura ao nivel do nucleo		2,6	2,6	2,6
Distancia do cinetoplasta á extremidade posterior		7,8	8,7	7,0
Nucleo	Comprimento	2,6	2,6	2,6
	Largura	1,7	1,7	1,7
Cinetoplasta	Comprimento	1,3	1,3	1,3
	Largura	0,4	0,4	0,4
Flagello livre		6,6	7,8	5,2

TYPO III

O typo que nos occupa é representado por exemplares ainda menores do que os precedentes e, proporcionalmente ao tamanho, ainda mais largos. Um dos aspectos mais caracteristicos desse typo é a proximidade do cinetoplasta do nucleo. As dimensões do nucleo e do cinetoplasta não variando sensivelmente nos differentes typos, succede que tambem aqui, em relação ás dimensões do corpo, se apresentam estes elementos maiores. Tambem o flagello é longo, relativamente ás dimensões do *Trypanosoma*. O protoplasma parece ser mais pobre em granulações do que o das formas restantes.

O protoplasma cora-se em violeta mais pallido do que os do typo I e o nucleo em tom vermelho habitual, sendo o cinetoplasta vermelho mais vivo (Fig. 3).

DIMENSÕES

		Media	*Maxima*	*Minima*
Comprimento total excluido o flagello		13 7	15.2	12.6
Largura ao nivel do nucleo		2 2	2.6	2.1
Distancia do cinetoplasta á extremidade posterior		3.7	4.3	3.5
Nucleo	Comprimento	2.1	2.1	2.1
	Largura	1.8	2.1	1.7
Cinetoplasta	Comprimento	1.3	1.3	1.3
	Largura	0.4	0.4	0.4
Flagello livre		6.4	7.0	6.1

Formas de reproducção

No *Trypanosoma butantanense* uma das verificações mais interessantes é o numero extraordinario das formas de reproducção que occorrem no sangue peripherico. Assumem estas formas os aspectos mais variados, indo desde a forma arredondada da *Leishmania* (Fig. 4), até a forma perfeita do *Trypanosoma*, passando pelas formas intermediarias de *Leptomonas* e *Crithidia* (Figs. 5 e 6). A impressão que se tem á primeira vista é a de estar examinando uma cultura e não uma lamina de sangue. Chamamos muito a attenção para o facto de tratar-se de sangue retirado de serpentes vivas e não (como se poderia suppor, devido á apparição de formas de *Leishmania*, *Leptomonas* e *Crithidia*) de sangue retirado para exame após a morte do animal, quando o trypanosoma se comportaria como meio de cultura artificial, apresentando então as formas denunciadoras de sua derivação phylogenetica.

A reproducção no sangue peripherico effectua-se quasi sempre pela forma binaria, predominando, porém, as formas anomalas, nas quaes os resultantes de divisão são desiguaes (Figs. 7 e 8). Por excepção, divisão multipla em tres e quatro, neste caso divisão multipla do cinetoplasta ou do nucleo em primeiro logar e posteriormente separação do protoplasma (Figs. 9 e 10).

Alem desta frequente anomalia, observa-se tambem o facto, em contradicção com a morphologia geral dos Trypanosomas, de preceder muitas vezes a divisão do nucleo á do cinetoplasta, vendo-se frequentemente o nucleo perfeitamente dividido e já afastados os dois nucleos filhos, ao passo que o cinetoplasta apenas teve sua divisão esboçada (Figs. 11, 12, 13 e 14).

As formas que mais frequentemente são vistas em reproducção são formas cujo cinetoplasta se encontra na mesma altura do nucleo, parecendo formas em transição entre *Crithidia* e *Trypanosoma*. Os resultantes dessa divisão são dois

elementos, um dos quaes é uma *Crithidia*, sendo o outro um *Trypanosoma* (fig. 8).

Seguem-se por ordem de frequencia, entre as formas vistas em divisão, as que se acham em phase de *Crithidia* (fig. 7), vindo depois os verdadeiros *Trypanosomata* (fig. 8) aos quaes se seguem as *Leptomonas* (fig. 6) e finalmente a de *Leishmania* (fig. 5).

Além das citadas, são ainda vistas muitas outras fórmas, quer representando variantes de um dos typos descriptos, quer fórmas anomalas que não se enquadram nestes typos (figs. 15-20).

ESTAMPA II

Coloração pelo methodo de Rosenbusch — Pelo methodo de coloração de Rosenbusch, observa-se, nos exemplares dos 3 typos descriptos, que o cinetoplasta apresenta forma mais linear do que a dos preparados corados pelo methodo de Giemsa; o nucleo em repouso tem zona de succo nuclear mais rica e um caryosoma bastante volumoso, central e redondo (figs. 1, 2, 3), sendo frequente ver-se um vacuolo na metade posterior do parasita.

As figuras 4, 5, 6 e 7 representam, respectivamente, formas de leishmania, leptomonas e crithidia.

As figuras 8 e 9 mostram formas de divisão dando resultantes de tamanho desigual, sendo que na fig. 8 está representada uma phase mais atrazada de divisão, na qual os dois caryosomas filhos ainda se apresentam ligados pela centrodesmose e a fig. 9 uma phase terminal do processo.

O facto, assignalado paginas atrás, de terminar-se a divisão nuclear antes da do cinetoplasta, é confirmado tambem pelo exame de preparados corados pela hematoxylina, como se verifica nas figs. 10, 11, 12.

Foi-nos igualmente dado observar, em preparados fixados a humido, formas de reproducção em que um dos resultantes é um trypanosoma, ao passo que o outro está ainda em phase de crithidia (figs. 9, 13, 14).

As figs. 15, 16, 17 representam formas anomalas coradas pelo methodo de Rosenbusch.

BIOLOGIA

Inoculações experimentaes

Trypanosoma butantanense é facilmente inoculavel, tendo sido obtidos inoculações positivas, quer com sangue, quer com culturas nas seguintes especies de ophidios: *Ophis merremii, Drymobius bifossatus, Spilotes pullatus, Leimadophis poecilogyrus, Chlorosoma schottii* e *Pseudoboa trigemina* entre as não venenosas e *Bothrops jararaca, Bothrops atrox* e *Bothrops alternata* entre as venenosas Mostraram-se refractarias: *Constrictor constrictor* e *Epicrates cenchria, Chiro-*

nius carinatus foi inoculada uma só vez, não tendo sido obtida infecção, nada se podendo concluir, porque tambem em *Ophis merremii*, embora excepcionalmente, falhou a inoculação. *Crotalus terrificus* foi inoculado varias vezes, como, porém, morre em poucos dias, quando manipulado com frequencia, nada se pode concluir quanto á sua sensibilidade á infecção experimental.

Alem de ophidios, foi tambem obtida a inoculação em um batrachio, *Bufo paracnemis* Lutz. De 5 exemplares, inoculados com sangue de *Ophis merremii* infectada, um apresentou infecção. Em 2 exemplares de *Bufo marinus* não foi obtida infecção.

As cobras infectadas pareceram soffrer pouco com o parasitismo, tendo-se a impressão de que a virulencia é diminuta, pois as cobras duram ainda muito tempo, apesar do numero colossal, muitas vezes, de *Trypanosomata* presentes na circulação.

Cultura artificial

Foram obtidos, aliás com certa difficuldade inicial, culturas em meio de NNN, preparado com sangue de coelho e com sangue de cobra, attribuindo-se a contaminação, tão frequentemente observada, a uma possivel bacteriemia das cobras conservadas em captiveiro em condições precarias de saúde.

Uma vez obtidas, as culturas se desenvolveram em geral com exhuberancia, casos havendo, porém, de mau desenvolvimento.

As culturas persistem vivas durante quasi todo o tempo em que existe agua de condensação no meio.

Continuamos a manter *T. butantanense* no laboratorio, por meio de inoculações successivas em serpentes e de culturas; estamos tentando ainda sua transmissão por meio do Ixodideo, *Amblyomma dissimile*.

RESUMO

No sangue de exemplares, naturalmente infectados, de Boipeva (*Ophis merremii* Wagler, 1824) foi encontrado um trypanosoma que, por seus caracteres morphologicos e propriedades biologicas, representa uma nova especie a ser chamada de *Trypanosoma butantanense*, n. sp.. Na phase adulta, este trypanosoma apresenta 3 typos differentes de morphologia; reproduz-se activamente no sangue de serpentes natural ou experimentalmente infectadas, apresentando então todas as phases conhecidas do cyclo evolutivo dos trypanosomas; infecta facilmente varias especies de ophidios que, todavia, não parecem ser por elle molestadas; finalmente, mostrou-se cultivavel no meio NNN, no qual sobreviveu emquanto havia presença de agua de condensação.

ABSTRACT

Trypanosoma butantanense, n. sp. has been found in naturally infested specimens of the Boipeva snake (*Ophis merremii* Wagler, 1824) and differs from *T. boipevae* (described elsewhere in this issue) by its small size, type of motility, polymorphism, heavier infestation (Pl. II, fig. 18), besides other morphological and physiological peculiarities.

Comparison of specimens in adult stage (*Trypanosoma*-form) discloses 3 different types: Type I bears a body larger and proportionately narrower, with a small nucleus, lying nearer the anterior end, a voluminous kinetoplasta at a great distance from the posterior extremity; the body is spiral-like behind the kinetoplasta; protoplasma granulous, pale violet. Nucleus red and kinetoplasta deeply red. Undulanting membrane narrow with little pronounced sinuosities, well visible (Pl. I, fig. 1). In type II the total length in decreased and the width increased; the length of the body behind the kinetoplasta is smaller and this portion is not spiral-like as in type I; the kinetoplasta is relatively larger; the nucleus is wider and occupies a more central position; the flagellum is shorter (fig. 2). In type III the body is still shorter and wider than in type II and kinetoplasta lies at a shorter distance from the nucleus. In comparison with the length the nucleus and the kinetoplasta are of larger size (fig. 3).

Reproduction takes place very actively in the blood of the naturally or experimentally infected snakes, a feature which is characteristic of this new species. The forms found in the blood of living snakes represent all stages known in the life-cycle of Trypanosomata: *Leishmania* — (fig. 4), *Leptomonas, Crithidia* — (figs. 5 and 6) and *Trypanosoma*-form, so as to appear as a real artificial culture of the parasite rather than anything else. It must be emphasized that this aspect was seen in living snakes; therefore, it has nothing in common with a simple culture that may occur in the blood of dead animals.

Reproduction is almost always binary and the resulting individuals are unequal (figs. 7 and 8). Exceptionnally multiple division may be seen (figs. 9-10). Division of the nucleus may preceed that of the kinetoplasta (figs. 11, 12, 13, 14), a fact that is also seen in blood-films stained by hematoxylin (figs. 10, 11, 12). The most frequent reproduction form bears the kinoteplasta at the level of the nucleus and seems to be an intermediate form between *Crithidia* and *Trypanosoma*, a *Crithidia* and a *Trypanosoma* (figs. 8, 9, 13, 14) resulting from the same division. Anomalous forms are seen in Pl. I. figs. 15-20 and Pl. II, figs. 15-17.

Trypanosoma butantanense in both blood and cultures is readily inoculable to other species of snakes, the following species having been found to be susceptible: *Ophis merremii, Drymobius bifossatus, Spilotes pullatus, Leima-*

dophis poecilogyrus, Chlorosoma schottii, Pseudoboa trigemina, Bothrops jararaca, Bothrops atrox and *Bothrops alternata.* In *Constrictor constrictor, Epicrates cenchria, Chironius carinatus* and *Crotalus terrificus* the experimental infection was unsuccessful.

One toad out of five (*Bufo paracnemis*) also became infectetd but in *Bufo marinus* it was not possible to obtain infection.

The infected snakes seemed to live about as long as those used as controls.

Culture was easily obtained in NNN medium (with rabbit's or snake's blood), and remained alive so long as condensation water was present in the medium.

(Trabalho da Secção de Protozoologia e Parasitologia do Instituto Butantan, dezembro de 1931).

593.16:616.961

PESQUISAS SOBRE TRYPANOSOMAS

II. *Trypanosoma manguinhense*, sp. n., parasita do bugio *Alauatta caraya* (Humboldt, 1809)

POR

J. B. ARANTES e FLAVIO da FONSECA

Muito pequeno é o numero de especies do genero *Trypanosoma* observadas em macacos brasileiros, cifrando-se os até hoje descriptos a *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (1), *Trypanosoma minasense* Chagas, 1908 (2, 3 e 4) e *Trypanosoma prowazeki* Behrenberg — Gossler, 1908 (5).

Em Junho de 1931, examinando preparados, corados pelo liquido de Giemsa, de sangue de bugio da especie *Alauatta caraya* (Humboldt, 1809), encontrámos um *Trypanosoma* de morphologia bastante diversa dos acima citados.

Provinha o macaco em questão da localidade denominada Cerqueira Cesar, Est. de São Paulo, tendo sido offerecido ao Instituto Butantan pelo sr. Augusto R. D. Arruda, ao qual agradecemos tão interessante material.

O trypanosoma alludido era extremamente raro nos esfregaços, nos quaes apenas foram vistos poucos exemplares.

Como se deprehende da gravura e da descripção abaixo, distingue-se o Trypanosomideo, por nós verificado em *Alauatta caraya*, com facilidade dos outros *Trypanosomata* assignalados em macacos brasileiros (Est. I, fig. 21).

Do *Trypanosoma prowazeki* Behrenberg — Gossler, 1908, differencia-se com facilidade, pois este, além de dimensões muito menores, apresenta blepharoplasta terminal, tal como *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1908, do qual muito se approxima.

Com o *Trypanosoma cruzi* tambem não é comparavel, differindo totalmente na morphologia.

Approxima-se mais do *Trypanosoma minasense Chagas*, 1908, do qual todavia se distingue pelos caracteres seguintes: em *Trypanosoma minasense*

a largura do corpo ao nivel do nucleo é maior e variavel, bem como ao nivel do cinetoplasta, segundo se deprehende das dimensões apresentadas por A. Carini (*loc. cit.*) e do exame da gravura apresentada por este pesquisador; o nucleo tem maior diametro transversal e não toca os bordos do corpo; o cinetoplasta é mais ou menos central, ao contrario do que succede ao *Trypanosoma* de *Alouatta caraya*, em que este é marginal ou sub-marginal.

O nome especifico, *Trypanosoma manguinhense*, é dado em homenagem ao Instituto Oswaldo Cruz, antigo Instituto de Manguinhos, no qual foram realizadas pesquisas da maior relevancia sobre Trypanosomas.

ASPECTO GERAL: — Trypanosoma relativamente grande e largo, apresentando-se o protoplasma bem corado em azul, ás vezes de aspecto finamente granulado e com zonas vacuolares localizadas principalmente nas proximidades do nucleo.

O nucleo é volumoso, occupa toda a largura do flagellado, apresentando coloração homogenea, vermelha pallida. O cinetoplasta é pequeno, de situação predominantemente marginal, arredondado e situado a meia distancia entre o nucleo e a extremidade posterior. A membrana ondulante, bem nitida, é estreita e se estende desde proximo do cinetoplasta até a extremidade anterior, descrevendo sinuosidades muito pronunciadas. O flagello, bem visivel desde o cinetoplasta, acompanha o bordo externo da membrana ondulante e se torna livre na extremidade anterior, onde apresenta comprimento variavel.

DIMENSÕES

Foram computados cinco exemplares que deram as medidas abaixo:

	Media	*Maxima*	*Minima*
Comp. total excluido o flagello livre	34 micra 54	36 micra 30	32 micra 37
Largura ao nivel do nucleo . . .	3 micra 50	3 micra 50	3 micra 50
Distancia do cinetoplasta à ext. post.	11 micra 12	14 micra 0	10 micra 50
Comprimento do nucleo	4 micra 35	5 micra 25	3 micra 50
Dimensão do cinetoplasta.	0 micra 50	0 micra 50	0 micra 50
Comprimento do flagello livre . . .	7 micra 52	10 micra 50	3 micra 50

Com sangue obtido por punção cardiaca foram inoculados um *Silenus rhesus* (*Macacus rhesus*) jovem, com 5 cc. de sangue por via peritoneal, e duas cobaias, com 2cc.5 de sangue pela mesma via, uma das quaes morreu accidentalmente no dia seguinte.

Nenhum desses animaes, porém, apresentou infecção, mesmo após exames prolongados e repetidos até data muito posterior.

Posteriormente foram feitas tentativas de isolamento do trypanosoma em questão em meios artificiaes, semeando-se sangue obtido por puncção cardiaca em sete tubos com meio de Noguchi para leptospiras e dez tubos de NNN.

No dia em que foram semeados taes meios, porém, não foi mais possivel ver trypanosoma no sangue pelo exame a fresco, o que correu certamente por conta do facto de ter sido o macaco dias antes inoculado com virus do typho exanthematico de fórma paulista, tendo apresentado forte reacção febril, achando-se nos ultimos dias de vida quando foi sangrado.

Seja pelo facto de não mais existirem trypanosomas na circulação, seja pela maior difficuldade opposta por esta especie ao cultivo artificial, não foi possivel o seu isolamento, tendo-se conservado estereis os tubos.

RESUMO

E' descripta uma nova especie de trypanosoma, *Trypanosoma manguinhense* sp. n., parasita do bugio de S. Paulo, *Alauatta caraya* (Humboldt, 1809).

Não foram conseguidas inoculações ou culturas do novo parasita.

ABSTRACT

Trypanosoma manguinhense, sp. n., is described as a parasite found in a Brazilian howler-monkey, *Alauatta caraya* (Humboldt, 1809). As pointed out in the text, this new species differs from all the other species hitherto described of Brazilian monkeys, thus: body broad and large; protoplasm coloured in blue by Giemsa, vacuolated near the nucleus and finely granulous; nucleus voluminous, as broad as the body itself; kinetoplasta small, generally marginal, rounded, lying halfway from nucleus and posterior end; undulanting membrane sinuous, narrow, extending from near the kinetoplasta to the anterior end; flagellum distinct, with variable length (Pl. I, fig. 21).

Measurements:

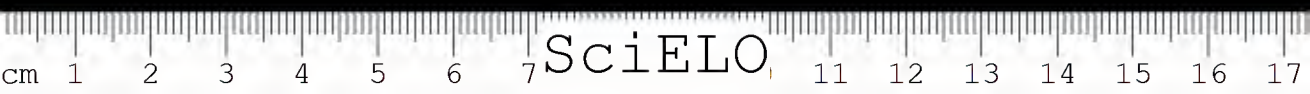
	Average	*Maximum*	*Minimum*
Total length, flagellum excluded . .	34 micra 54	36 micra 30	32 micra 37
Breadth at nuclear level	3 micra 50	3 micra 50	3 micra 50
Distance kinetoplasta-posterior end .	11 micra 12	14 micra	10 micra 50
Length of nucleus.	4 micra 35	5 micra 25	3 micra 50
Length of kinetoplasta	0 micra 50	0 micra 50	0 micra 50
Length of flagellum	7 micra 52	10 micra 50	3 micra 50

Culture in NNN and Noguchi's medium as well as inoculation in a young *Silenus rhesus* (syn. *Macacus rhesus*) were negative.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Chagas, C.* — Arch. f. Schiffs-u. Tropenhyg. XII(4):120.1909; Sciencia Medica II(2):75.1924; C. R. Soc. Biologie XC(12):873.1924.
2. *Chagas, C.* — Brasil Medico XXII(48):471.1908; Arch. f. Schiffs-u. Tropenhyg. XIII(4):120.1909; Bull. Soc. Path. Exotique V(2):304.1912.
3. *Carini, A.* — Arch. f. Schiffs-u. Tropenhyg. XII:447.1909.
4. *Cerqueira, D.* — Sciencia Medica II(3):155.1924
5. *Behrenberg & Gossler* — Arch. f. Schiffs-u. Tropenhyg. XII:541.1908; Malaria I(1): 53.1908; Laveran & Mesnil — Trypanosomes et Trypanosomiases :812.1912.

(Trabalho da Secção de Protozoologia e Parasitologia do Instituto Butantan, dezembro de 1931).

593.16:616.961

PESQUISAS SOBRE TRYPANOSOMAS

III. *Trypanosoma merremii*, sp. n., parasita da serpente *Ophis merremii* Wagler, 1824

POR

J. B. ARANTES e FLAVIO da FONSECA

Por occasião de estudos parasitologicos em ophidios, tivemos opportunidade de observar em *Ophis merremii* Wagler, 1824 (boipeva) parasitismo por um flagellado do genero *Trypanosoma*, que foi verificado por seis vezes em condições naturaes, no sangue peripherico de exemplares de procedencia diversa.

Verificámos posteriormente que a especie de ophidio em questão, tambem póde ser parasitada por um outro *Trypanosoma*, de caracteres perfeitamente distinctos, que será objecto de uma communicação á parte.

A especie que descrevemos é rara, pois elevou-se a muitas dezenas o numero de exemplares de *Ophis merremii* examinados.

Exame a fresco — O trypanosoma é pouco abundante no sangue peripherico em condições naturaes, sendo dotado de pequena mobilidade, custando a deslocar-se, o que talvez corresse em parte por conta da compressão da laminula sobre seu volumoso corpo. A extremidade do flagello é geralmente curta, dando impressão de que a membrana ondulante quasi attinge sua porção terminal.

O nucleo é visivel sob a fórma do corpo granuloso e refrigente. Cinetoplasta visivel sob a fórma de agglomerado de granulações, situadas no inicio da porção mais estreitada do corpo, no ponto em que tem inicio a membrana ondulante.

Vêem-se granulações esparsas por todo o corpo, mais numerosas na extremidade posterior.

Exame após coloração pelo Giemsa

ASPECTO GERAL — Trypanosoma de grandes dimensões, apresentando grande tendencia para enrolar-se sobre si mesmo, corando-se com facilidade. O protoplasma toma coloração violeta pallida, apresentando-se finamente granuloso, podendo mostrar zonas vacuolares, ás vezes numerosas, porém de pequenas dimensões.

O nucleo é alongado no sentido do grande eixo, collocado mais ou menos a meia distancia das duas extremidades, não tocando os bordos do corpo; cora-se em vermelho, apresentando granulações de aspecto uniforme por toda sua massa, intensamente coradas em vermelho.

O cinetoplasta é marginal, situado bem mais proximo do nucleo do que da extremidade posterior do parasita, de maior dimensão transversal e de coloração mais viva do que o nucleo. A membrana ondulante, muito nitida e larga, é bastante ondulada e percorre toda a margem do corpo desde o cinetoplasta até a extremidade anterior.

O flagello, adherente á margem externa da membrana ondulante, é muito nitido, sendo sua porção livre relativamente reduzida (Est. I, fig. 22).

Este *Trypanosoma* caracteriza-se, portanto, pelo seu constante monomorphismo, bem como pela ausencia de fórmas de reproducção no sangue peripherico

DIMENSÕES:

Foram medidos sete exemplares, dos quaes se calcularam os dados abaixo:

	Média	*Maxima*	*Minima*
Comprimento total excluido o flagello . .	70 micra 8	77 micra 8	64 micra 7
Largura ao nivel do nucleo	8 micra 1	10 micra 5	6 micra
Distancia do cinetoplasta á extremidade post	32 micra 0	36 micra 6	26 micra 2
Nucleo { Comprimento	8 micra 24	10 micra 0	7 micra 0
Nucleo { Largura.	4 micra 8	6 micra 1	3 micra 5
Cinetoplasta { Comprimento	1 micra 4	1 micra 7	0 micra 8
Cinetoplasta { Largura	0 micra 7	0 micra 8	0 micra 5
Flagello livre	4 micra 6	8 micra 7	0 micra 0

Para o *Trypanosoma* que acabamos de descrever propomos o nome de *Trypanosoma merremii*, sp. n., do nome especifico do ophidio em que é encontrado.

Por varias vezes tentada a obtenção de culturas em meios apropriados (N N N original e N N N com sangue de boipeva e meio de Noguchi para leptospiras), sempre sem resultado, apesar de não terem os meios sido contaminados.

Da mesma fórma foram infructiferas as tentativas de inoculação desse trypanosoma em serpentes da mesma especie.

A especie em questão não póde, pelos motivos apresentados, ser mantida viva no laboratorio.

Nos seis casos em que nos foi dado observar parasitismo pelo *Trypanosoma* em causa, pareceu-nos ser este relativamente bem tolerado pelas serpentes.

RESUMO

Os auctores descrevem uma nova especie de trypanosoma, *Trypanosoma merremii*, sp. n. parasita de *Ophis merremii* Wagler, 1824, observador por duas vezes em infecção natural entre muitas dezenas de cobras examinadas.

Não foram conseguidas culturas, nem foi obtida inoculação positiva em outros ophidios da mesma especie.

ABSTRACT

Trypanosoma merremii, sp. n. is described as a parasite found in the snake *Ophis merremii* Wagler, 1824. When stained by Giemsa its protoplasm appears finely granulous, vacuolated and coloured in pale violet. Its nucleus is elongated and lies about halfway between the anterior and posterior extremities; it is narrower than the body, appearing coloured in red and granulous. The kinetoplasta lies nearer the nucleus than the posterior extremity, is broader than long and has a more deeply red color than the nucleus. The undulanting membrane is broad, wavy and distinguishable from the kinetoplasta at the anterior extremity of the body. The flagellum is short. This *Trypanosoma* seems to be strictly monomorphic; division forms were not seen in the peripheral blood (Pl. I, fig. 22).

MEASUREMENTS:

	Average	*Maximum*	*Minimum*
Total length, flagellum excluded . . .	70 micra 8	77 micra 8	64 micra 7
Breadth at nucleus level	8 micra 1	10 micra 5	6 micra 0
Distance kinetoplasta-post. extremity . . .	32 micra 0	36 micra 6	26 micra 2
Nucleus { length	8 micra 24	10 micra 0	7 micra 0
Nucleus { breadth	4 micra 8	6 micra 1	3 micra 5
Kinetoplasta { length.	1 micra 4	1 micra 7	0 micra 8
Kinetoplasta { breadth	0 micra 7	0 micra 8	0 micra 5
Flagellum	4 micra 6	8 micra 7	0 micra 0

Cultures in NNN (with snake or rabbit blood) and Noguchi's medium, as well as inoculation in snakes of the same species were negative.

(Trabalhos da Secção de Protozoologia e Parasitologia do Instituto Butantan, dezembro de 1931).

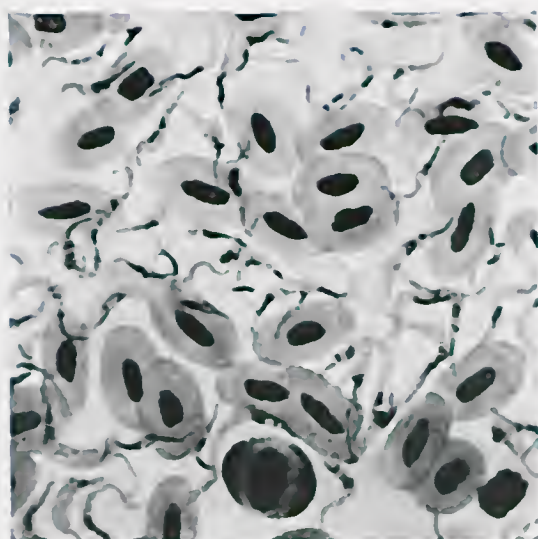
Estas 3 Notas foram apresentadas á Semana de Laboratorio (Soc. Med. & Cirurgia. S. Paulo), Janeiro de 1932.

Mem. Inst. Butantan
Vol. VI, 1931

ESTAMPA I

Escala microm.

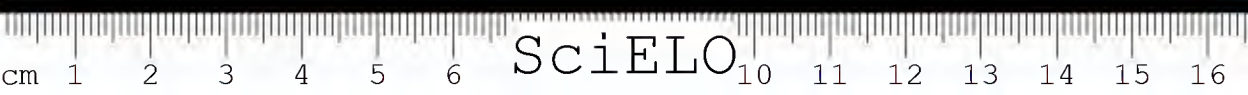
5µ 10µ 15µ 20µ

ESTAMPA II

Oc. (10x) periplan. Leitz
Obj. apt. 1,32 (92x) apochrom. Leitz 2mm.

ESTUDOS PARASITOLOGICOS

POR

J. B. ARANTES

616.96:593.16

ESTUDOS PARASITOLOGICOS

I. Do comportamento do *Trypanosoma Cruzi* no *Silenus rhesus*

POR

J. B. ARANTES

Trabalhando com *Trypanosoma cruzi* existente em "barbeiros" da especie *Triatoma infestans*, encontrados numa casa velha duma fazenda do municipio de Orlandia, neste Estado, pelo sr. Theophilo Martins, quando, em serviço deste Instituto, fôra escolher animaes para immunização, verificamos seu alto gráu pathogenico para *Silenus rhesus*, provocando infecção fatal em seis destes animaes experimentados.

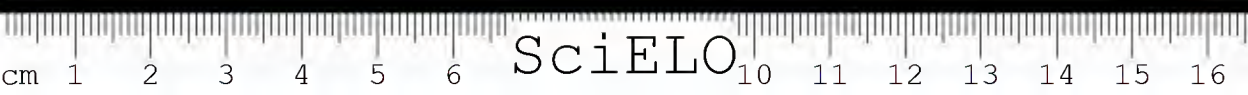
Os primeiros dois macacos foram inoculados com sangue infectante de cobaias que haviam sido injectadas com fézes de barbeiros abundantes em fórmas em crithidia.

O macaco n. 3 foi injectado com sangue do n. 1, quando mostrava em seu sangue peripherico numero regular de parasitas.

O n. 4 foi injectado com fezes de barbeiros com estadia de seis meses no laboratorio, alimentados neste periodo em cobaia. Os dois ultimos, ns. 5 e 6 foram injectados com sangue de coração do macaco n. 4, quando mostrava em seu sangue 4 a 5 trypanosomas por campo visto com grande augmento a secco.

Todos os seis macacos inoculados o foram subcutaneamente com 1 cc. de material infectante: um com fézes de barbeiros diluidas em sôro physiologico, dois com sangue de cobaia. tres com sangue de outro macaco.

A duração destes animaes injectados variou de trinta e dois dias, como prazo minimo, para o n. 1 e, maximo, de 83 dias para o n. 5.

Não houve uniformidade mesmo naquelles injectados da mesma fórma; dos tres injectados com sangue de outro macaco: o n. 6 durou trinta e cinco dias; o n. 3 resistiu mais, morrendo depois de 65; o n. 5 mais ainda, pois só morreu 83 dias depois da inoculação, o mesmo acontecendo com dois inoculados com

sangue de cobaia infectada: o n. 1 durou trinta e dois dias e outro, n. 2, setenta e dois. Depois duma semana de inoculação é que foram encontrados os primeiros trypanosomas em exames a fresco do sangue peripherico, em outros animaes só após dezeseis dias como prazo maximo. Inicialmente eram raros; após tempo variavel augmentavam de numero, nos mais abundantes a seis em media por campo visto com grande augmento microscopico a secco. Nessa occasião todos os macacos apresentaram a temperatura elevada: approximadamente 41°. O numero de parasitas no sangue, depois de attingir um maximo, tende a diminuir e mesmo desapparecer. A temperatura tambem decahe: antes de morrer apresenta-se o animal em hypothermia.

Não pareceu haver nestes casos molestia intercurrente. Na occasião da necropsia de cada animal, preparados a fresco eram feitos para exame immediato, esfregaços e preparados por impressão dos diversos organs que tambem forneceram material para fixação, inclusão e córtes.

O exame assim feito mostrou, desde o primeiro material examinado, grande abundancia de parasitas, em fórma de leishmania ou intermediaria, mas prinpalmente fórmas adultas em material colhido do coração, musculo peitoral e outros musculos.

Esta observação foi confirmada depois pelo exame dos córtes corados, feito em material dos seis animaes necropsiados.

Com pequeno poder ampliador já se verifica a presença de grandes e numerosas zonas mais coradas pelas côres basicas, destacando-se do resto do musculo. Com maior augmento verifica-se que muitas fibras são quasi inteiramente occupadas por trypanosomas ou na fórma de leishmania de transição, ou principalmente na fórma adulta. Tambem se verificam parasitas isolados esparsos, em numero não pequeno sob as diversas fórmas de evolução, dentro e fóra da fibra muscular. Em algumas fibras onde existiram grandes agrupamentos e que pela ruptura deram sahida aos trypanosomas, seu tecido nobre é substituido por tecido de cicatrização. Em outros pontos ha verdadeiros fócos de necrose.

Est. I, fig. 1: córte de coração de *Silenus rhesus*, fixado pelo formol a 10 % e corado pelo processo de Giemsa: vê-se uma fibra cardiaca abundantemente parasitada pela fórma adulta do *Trypanosoma cruzi*.

Microphotographias, Est. II, figs. 1, 2 e 3: córte longitudinal de musculo peitoral, fixado pelo sublimado-alcool de Schaudinn, corado pelo Giemsa; na fig. 1 vê-se uma fibra muscular estriada, parasitada em seu centro por formas em leishmania; na fig. 2 vê-se uma fibra muscular estriada, intensamente parasitada por fórmas adultas; na fig. 3 vê-se outra fibra muscular estriada, completamente cheia de *Trypanosoma cruzi* em differentes estados de evolução e difficeis de se distinguir devido ao accumulo de parasitas; as figs. 4, 5 e 6 representam cortes longitudinaes de coração, fixados pelo formol a 10% e corados pelo Giemsa: nestas tres microphotographias vêem-se fibras mus-

culares cardiacas geralmente prejudicadas na sua textura por infestação intensa pelo *Trypanosoma cruzi* que apparece com predominio manifesto da forma adulta.

Pelo exame de algumas destas photographias, verificamos o predominio das fórmas adultas que apparecem com o cinetoplasta redondo intensamente corado, e menos apparentes nucleo e protoplasma, não se vendo nitidamente todo o parasita adulto pela differença de nivel em que ficam no córte suas partes componentes.

As fórmas em leishmania apparecem em menor numero e apparentam maior tamanho, pois, sendo fórmas arrendondadas, são vistos em conjuncto protoplasma, nucleo e cinetoplasta que neste caso geralmente é em bastonete.

RESUMO

Verificamos uma amostra de *Trypanosoma cruzi* ser muito pathogenica para o *Silenus rhesus;* dentre seis animaes inoculados: um, directamente com fézes de *Triatoma infestans,* dois, por meio de sangue de cobaia infectada, tres, com sangue de macaco já infestado, todos tiveram molestia experimental com 100 % de morte.

Ao grande parasitismo dos musculos cardiacos e estriados pelo *Trypanosoma cruzi* accresce a particularidade da predominancia dos agrupamentos em fórma adulta sobre os de forma intermediaria e de leishmania.

ABSTRACT

A sample of *Trypanosoma cruzi* has been encountered which is very pathogenic for *Silenus rhesus.* In a group of six *Silenus* monkeys, of which one was inoculated directly with faeces of *Triatoma infestans,* two with blood of an infected guinea-pig and three with blood of an infected *Silenus,* all developed the infection and died from it (100% mortality).

Besides the marked parasitic infestation of both the skeletal and the cardiac muscles by *Trypanosoma cruzi,* the lesions found were characterized by the definite preponderancy of groups of the adult forms over those of both the intermediate and the leishmania-like forms (Pl. I, fig. 1; pl. II, figs. 1-6).

(Trabalho da Secção de Protozoologia e Parasitologia do Instituto Butantan, dezembro de 1931).

593.19:616.961

ESTUDOS PARASITOLOGICOS

II. *Haemogregarina butantanensis*, sp. n., parasita da boipeva, *Ophis merremii* WAGLER, 1824

POR

J. B. ARANTES

Ha varios annos vimos praticando exames de esfregaços de sangue, humano e animal, á procura de hemo-parasitas. Examinando recentemente o sangue peripherico de exemplares de *Ophis merremii* Wagler, 1824, especie conhecida vulgarmente pelo nome "boipeva", tivemos occasião de encontrar uma hemogregarina encapsulada em infestação muito adiantada.

Os parasitas, quando endoglobulares, localizavam-se, na maioria das vezes, parallelamente ao maior diametro do nucleo do erythrocyto; quando existiam dois num só globulo, deixavam o nucleo de permeio, como vemos nos desenhos (Est. I, fig. 2) ou lateralmente (fig. 3). Existindo tres parasitas, o nucleo encontrava-se em geral muito comprimido lateralmente (fig. 4). A's vezes tambem acontecia encontrarem-se os parasitas entrecruzados (fig. 5), em vez de parallelos, quando occorriam dois no mesmo erythrocyto.

Dentro dos globulos essa hemogregarina apresentava-se sempre encapsulada; ella abandonava essa capsula em sua phase vermicular, raramente dentro do proprio globulo (fig. 6); na maioria das vezes, ella deixava o globulo, ainda coberta com a capsula (fig. 7), da qual procurava desprender-se dobrando-se e distendendo-se bruscamente. Esse movimento, operado sobre o maior diametro, forçava a capsula, que ficava assim muito esticada na direcção da pressão que se exercia sobre as suas extremidades; em um dado momento, rompia-se a capsula por uma das pontas e della sahia o parasita (figs. 8, 9, 10 e 11). Si a abertura da capsula era muito estreita, o parasita sahia por meio de movimentos ameboides; si, porém, era bastante larga, elle apresentava apenas o movimento commum de reptação, parecendo que, de qualquer maneira, sua extremidade posterior, mais estreita, servia de orientador: percebia-se perfeitamente movimento antecipado dessa extremidade para a direita ou para a esquerda, antes mesmo que o parasita tomasse qualquer direcção definitiva.

Ao exame a fresco, além de se notar o que acaba de ser referido, percebia-se igualmente que a extremidade mais grossa do parasita era a anterior e que seu nucleo se achava mais perto da extremidade posterior, mais afilada.

Nos esfregaços fixados pelo sublimado-alcool de Schaudinn e corados pela hematoxylina ferrica de Heidenhain ou de Rosenbusch, as capsulas não se coravam, ficando apenas em seu logar um espaço vazio, ao redor dos parasitas, quando ainda em phase propicia.

Ao exame desses esfregaços devidamente corados, verificava-se que as dimensões do parasita, quando encapsulado, eram em media de 0,87 × 3,9 micra; fóra da capsula, suas dimensões eram em media de 0,5 × 5,25 micra, tendo seu nucleo, de maior diametro, no sentido longitudinal, 0,5 × 1,3 micra. Via-se, assim, que o parasita era mais comprido fóra da capsula, o que indicava, portanto, achar-se elle mais ou menos comprimido dentro della, cuja distensão e rompimento eram assim facilitados.

O parasita que acabamos de descrever, não só não havia ainda sido assignalado na Boipeva (*Ophis merremii*), mas ainda tinha um processo de eclosão da capsula bem caracteristico, conforme se vê ao exame dos desenhos annexos e da Photographia n. 1; além disso, apresentava elle fórmas eschizogonicas por nós encontradas em córtes do coração, alem daquellas já assignaladas, em relação a outras especies, principalmente no pulmão e no figado. Essas formas eschizogonicas, descobertas no coração (Est. II, figs. 8, 9), apparentemente nelle não produzem reacção, pelo menos accentuada; todavia, quando existentes em grande numero, é provavel que não o deixem de prejudicar, pelo menos pelo effeito mecanico de compressão que sobre elle exercerão. Em córtes do coração descobrem-se pequenos espaços vazios, correspondentes, em aspecto e tamanho, aos occupados pelas formas eschizogonicas; pela evolução destas formas e sua destruição em seguida á formação dos merozoitos, aquelles espaços transformar-se-iam em pequenas cavidades.

As formas eschizogonicas apresentavam as dimensões medias de 16,7 × 22,7 micra e, quando já formados, os merozoitos contavam-se em numero de 14 a 26 individuos.

Conquanto a serpente parasitada tenha durado muito tempo em captiveiro, é provavel que a hemogregarina não a tenha deixado de prejudicar pela intensidade da infecção, porquanto havia invadido grande numero de erythrocytos que mais tarde rompia e destruia, ao se libertar delles: na Est. II, fig. 7 percebem-se residuos de erythrocytos em plena destruição.

Os esfregaços correspondentes aos desenhos e Est. II, fig. 7 foram fixados pelo alcool absoluto e corados pelo methodo de Giemsa.

O córte de coração, representado nas figs. 8, 9 (Est. II) foi feito em material fixado pelo formol a 10 %, incluido em parafina e corado pela hematoxylina-eosina e hematoxylina de van Gieson.

Em virtude dos caracteres acima descriptos, achamos que se tratava de uma nova especie que descrevemos agora com o nome de *Haemogregarina butantanensis*, sp. n..

RESUMO

No sangue peripherico de um exemplar de *Ophis merremii*, serpente aglypha, foi encontrada uma hemogregarina que se apresenta sempre encapsulada quando se acha dentro do erythrocyto. *Haemogregarina butantanensis*, sp. n., sae, ainda encapsulada, do interior do globulo; sua capsula é bem coravel pelo methodo de Giemsa, mas não o é pela hematoxylina ferrica.

O parasita descripto deve corresponder a uma nova especie, não só por ainda não ter sido assignalado na *Ophis merremii*, como por apresentar um processo especial de ruptura da capsula, bem visivel nos desenhos (Est. I e Est. II, fig. 7), e tambem pela presença de fórmas eschizogonicas encontradass em córtes do coração (Est. II, figs. 8, 9). A perfuração produzida pelas hemogregarinas encapsuladas, ao se libertarem, determina uma grande destruição de globulos vermelhos. As dimensões medias do parasita eram: a) quando encapsulado — 0,87 × 3,9 micra; b) fóra da capsula — 0,5 × 5,25 micra; nucleo, de diametro maior no sentido longitudinal, 0,5 × 1,3 micra; formas eschizogonicas — 16,7 × 22,7 micra; numero de merozoitos resultantes — de 14 a 26.

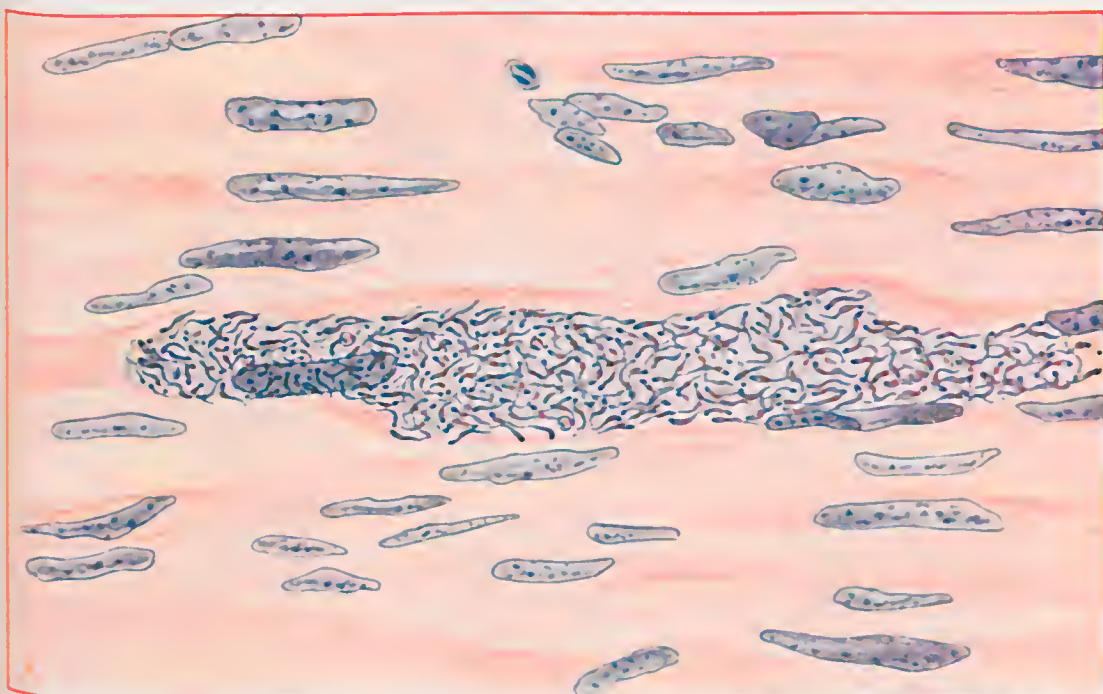
ABSTRACT

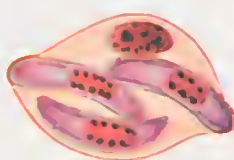
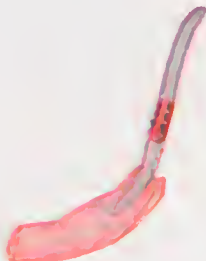
In the peripheral blood of the aglyph snake, *Ophis merremii*, there has been found a new hemogregarina always bearing a capsule when inside of the erythrocyte. *Haemogregarina butantanensis*, sp. n. is still encapsulated at the moment it leaves the erythrocyte; the capsule stains well by Giemsa but not so by ferric hematoxylin.

This blood parasite seems to represent a new species, not only for not having been yet reported in *Ophis merremii*, but also for showing a peculiar process of capsule rupture as clearly indicated in the enclosed drawings and photo no. 1 as well as for bearing schizogonic forms to be found in sections of the heart. The average size of this parasite is the following: a) when encapsulated — 0,87 × 3, 9 micra; b) when free — 0,5 × 5,25 micra; nucleus, of greater longitudinal diameter, 0,5 × 1,3 micra; shizogonic forms — 16,7 × 22,7 micra; number of resulting merozoits — from 14 to 26 (Pl. I, figs. 2-11; pl. II, figs. 7-9).

(Trabalho da Secção de Protozoologia e Parasitologia do Instituto Butantan — dezembro de 1931).

Notas apresentadas á Semana de Laboratorio (Soc. Med. & Cirurgia S. Paulo), Janeiro de 1932.

Mem. Inst. Butantan
Vol. VI. 1931

ESTAMPA I

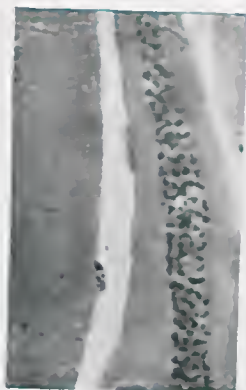
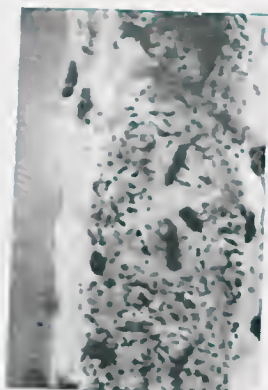
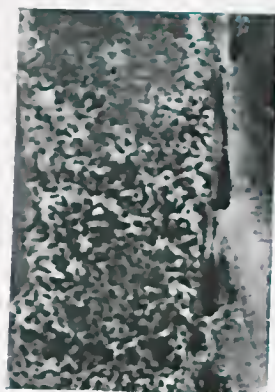
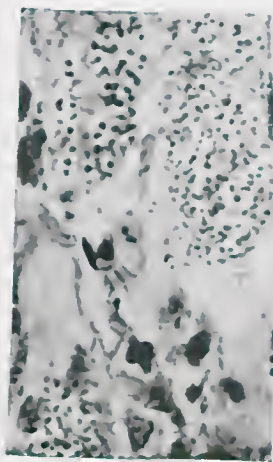
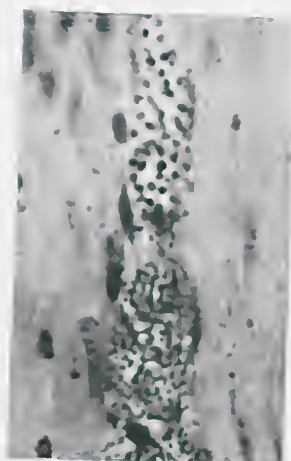
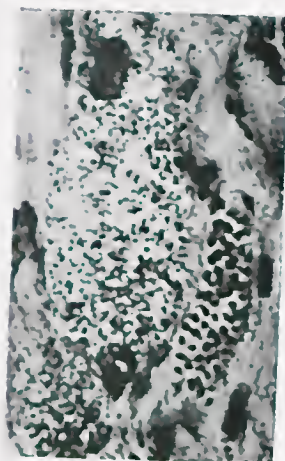
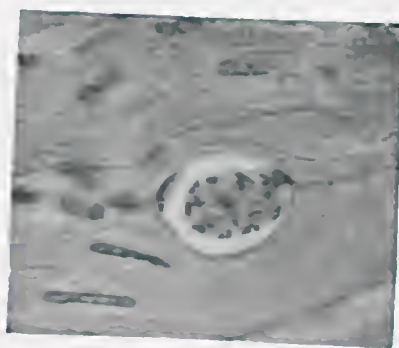
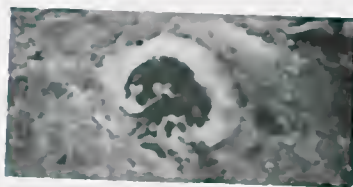
1 — Trypanosoma cruzi

Haemogregarina butantanensis, sp. n.

ESTAMPA II

1 2 3 4 5 6

Trypanosoma cruzi

7 8 9

Fot. B. Silva.

Haemogregarina butantanensis, sp. n.
Oc. (10x) periplan. Leitz
Obj. apt. 1,32 (92x) apochrom. Leitz 2 mm.

PONTOS DE VISTA BASICOS NA THERAPEUTICA DO OPHIDISMO

POR

AFRANIO DO AMARAL

615.37:612.314.51:591.69

PONTOS DE VISTA BASICOS NA THERAPEUTICA DO OPHIDISMO

POR

AFRANIO DO AMARAL

O cuidadoso estudo feito, nestes ultimos annos, de estatisticas realizadas no Brasil e nos Estados Unidos, sobre a evolução clinica de innumeros casos de accidentes ophidicos e de sua resposta ao tratamento especifico, tem permittido resaltar o papel que certos factores, até ha pouco relativamente desprezados, podem representar no caso ora discutido.

Esses factores são os seguintes:

1.° Constante gravidade maior do envenenamento em crianças e pequenos animaes;

2.° uso de medicação popular de urgencia;

3.° via de applicação do soro especifico;

4.° repetição das injecções a curtos intervallos;

5.° cicatrização das ulceras resultantes de certos envenenamentos.

Examinemos esses pontos separadamente.

Constante gravidade maior do envenenamento em crianças e pequenos animaes

Em trabalho recente (1) mostrei que, qualquer que seja o typo de envenenamento, a dose de antiveneno a empregar em caso de picada em crianças e pequenos animaes deve ser sempre maior do que a indicada para adultos e grandes animaes, ou, por outra, deve ser inversamente proporcional ao tamanho ou peso da victima: *o volume do soro deve ser tanto maior quanto mais leve for o paciente.*

A explicação deste facto reside em que a cobra, ao picar, trata apenas de defender-se contra um provavel aggressor. Sem ter meios de discernir entre um inimigo grande e um pequeno e, pois, mais ou menos temivel, a serpente não

gradua a quantidade de veneno a inocular. Dessa circunstancia resulta que, em geral, a dose de peçonha injectada é mais ou menos a mesma, qualquer que seja a victima.

Si nós considerarmos agora que todos os venenos matam quando attingem nos tecidos uma concentração mais ou menos fixa, o que em toxicologia e immunologia se chama de dose minima letal (DML), é facil comprehendermos que, quanto menor for a pessoa ou o animal offendido, mais depressa e facilmente essa concentração será attingida. E' isso, de facto, o que a pratica tem demonstrado e o que se pode reproduzir do ponto de vista experimental.

Assim, si se tomam varios animaes (cães, por exemplo) de pesos differentes e se injecta em cada um delles a mesma quantidade de um determinado veneno, se verifica que, sem excepção, os symptomas conducentes á morte são tanto mais graves e mais depressa apparecem quanto menor é o animal. Si, porém, se invertem os termos da experiencia e, tomando-se alguns animaes do mesmo peso, se injecta em cada um delles uma dose differente de um determinado veneno, se observa que os symptomas conducentes á morte são mais graves e occorrem mais depressa justamente naquelle que recebe maior quantidade de veneno em relação ao seu peso.

Si neste segundo grupo, de animaes de igual peso, se inocula a mesma dose de veneno, procurando-se salvár a todos por meio do soro especifico dado pela via mais adequada, verifica-se o seguinte:

A. — Si os animaes são tratados no mesmo intervallo, com dose identica de antiveneno, todos recuperam mais ou menos ao mesmo tempo.

B. — Si, porém, são tratados em intervallos differentes, recupera primeiro aquelle que mais depressa é inoculado com o soro. Outrosim, nestas condições, a dose curativa do especifico passa necessariamente a variar na mesma ordem: é tanto maior quanto mais tardiamente é empregada, porque, neste caso, a intoxicação dos tecidos se acha mais adiantada e as lesões mais accentuadas.

Não se tendo em vista estes factos, poder-se-ia pensar que, por simples injecção, nas crianças e pequenos animaes, de uma dose de soro correspondente ás minimas mortaes do veneno nelles inoculadas pela serpente, se evitaria completamente o effeito toxico. Isto, porém, não se dá na pratica, porque intervém então no caso o factor tempo que actua na ordem inverna do peso: a intoxicação geral é tanto mais rapida quanto mais leve ou menor é a victima, isto é, quanto menor for a massa do corpo que a peçonha tem de impregnar. Na verdade, é devido á concorrencia desses factores que as crianças e os pequenos animaes ás vezes morrem, a despeito mesmo do tratamento.

E' isto pelo menos o que as recentes estatisticas do Instituto Butantan revelam a um exame menos superficial. Considerando-se, por exemplo, englobadamente os casos de picada, communicados ao Instituto e tratados por antivenenos nestes 6 ultimos annos (1926-1931), verifica-se que seu numero ascende a 1.520.

Desse total de casos tratados, 969 correspondem a pessoas adultas: 294, a crianças até 15 annos; 257, a animaes de todas as especies. A mortalidade, que foi apenas de 2,48% entre os adultos, chegou a 4,42% entre as crianças e a 8.94% entre os animaes, sendo de notar que, entre estes, só os cães contribuiram com mais de 1/3. Sem duvida, nos dois ultimos grupos, alem do pequeno porte ou peso (massa do corpo), contribuem para difficultar o tratamento as seguintes circunstancias: as crianças, quando picadas, só raramente podem contar com exactidão o que lhes succedeu e, por isso, não facilitam a applicação do soro especifico, facto que entre os animaes occorre com o aggravante de geralmente só virem elles a ser tratados quando alguem lhes dá pela falta e, pois, quando a intoxicação já lhes está muito adiantada: num caso, indecisão do tratamento, complicada, no outro caso, por demora de sua applicação, a concorrer para a elevação da mortalidade nesses dois grupos.

Nestas condiçõeõs, geralmente, quando o soro é administrado, o envenenamento já tem produzido, nos centros vitaes da economia, lesões tanto mais graves e irreparaveis quanto maior for a concentração em que actuou a peçonha.

Assim sendo, *o unico meio que se pode empregar para contrabalançar até certo ponto essa desvantagem da parte das crianças e pequenos animaes é dar-lhes doses sempre maiores de soro.*

E' bem verdade que, á luz dos nossos actuaes conhecimentos, a efficacia do tratamento especifico está ligada tambem a certos factores, taes como:

a) dependentes das victimas — relativa avidez dos tecidos para com certos principios dos venenos, concorrencia de lesões preexistentes, grau de immunidade adquirida, etc.;

b) dependentes do antiveneno — actividade especifica, relativa avidez para com os elementos vitaes affectados ou os principios toxicos, densidade, concentração ionica ou composição electrolytica, etc.. Esses factores, porém, ou exercem influencia pouco decisiva no caso, ou são convenientemente comprehendidos na technica de preparo dos soros curativos.

Uso de medicação popular de urgencia

Nunca é demasiado insistir na necessidade de se contraindicarem em absoluto os remedios caseiros a que, assim os lavradores nacionaes, como os trabalhadores estrangeiros, costumam recorrer em casos de envenenamento ophidico. Esses tratamentos empiricos consistem, sobretudo, no uso de beberagens as mais diversas com base de alcool e kerozene. O alcool é em geral administrado de mistura com productos de origem vegetal, taes como alho, cebola, fumo, araticum e muitas outras substancias, cujo numero no Brasil deve andar por perto de uma centena. O kerozene é administrado tambem por via gastrica e em doses variaveis, de accordo com a maior ou menor ignorancia dos curandeiros.

No uso de remedios alcoolicos cumpre distinguir o que corre por conta dos principios vegetaes e o que é devido ao excipiente. *Dentre as innumeras plantas no particular recommendadas entre nós, não se poude demonstrar até agora em nenhuma a menor influencia therapeutica.* Ainda ha pouco tempo Mhaskar e Caius (2) chegaram a identica conclusão no estudo que fizeram de 314 vegetaes usados na India pelo povo no tratamento de picadas de cobra. E' destes auctores a seguinte affirmação: "Nenhuma das plantas indianas recommendadas para o tratamento de picadas de cobra exerce no caso qualquer effeito preventivo, neutralizante ou therapeutico".

No referente à acção do vehiculo alcoolico, é sabido que ella é apenas nociva. *Longe de curar ou siquer facilitar a marcha do envenenamento, o alcool, pelo contrario, a difficulta, porque, determinando num primeiro tempo um augmento da tensão arterial, favorece a absorpção do veneno; causando, numa segunda phase, uma baixa da pressão sanguinea, retarda a reacção do organismo e a eliminação do toxico.* Porisso, administrado sob qualquer forma, o alcool produz dois effeitos oppostos ao que se deve obter na cura do envenenamento e que é a parada da absorpção do veneno seguida de sua eliminação mais rapida possivel.

Em certos casos o alcool é empregado com o proposito de embriagar a victima, tirando-lhe a consciencia do perigo ou embotando-lhe a dor. Todavia, quando esse effeito é attingido, a acção nociva acima assignalada, sobre a absorpção e eliminação do toxico, torna-se muito maior.

Quanto ao kerozene, seus effeitos são mais prejudiciaes ainda. *Sobre não exercer qualquer acção benefica no envenenamento, este derivado do petroleo aggrava, pelo contrario, os symptomas, porquanto por si só é capaz de causar uma intoxicação aguda com destruição do sangue e degeneração do figado.*

Via de applicação do soro especifico

Dada a diversidade de effeitos e do modo de absorpção das peçonhas, é indispensavel que em todos os casos se procure determinar com cuidado o typo do envenenamento, tanto mais quanto desse conhecimento decorre a escolha da via de introducção do soro curativo.

E' sabido que os ophidios que em nosso meio causam maior numero de accidentes, se reunem, do ponto de vista zoologico e immunologico, em dois grupos principaes: o crotalico e o bothropico. O veneno crotalico neotropico (sobretudo o sul-americano) é absorvido muito rapidamente e attinge os centros vitaes por intermedio dos troncos nervosos. Possuindo uma acção quasi que estrictamente neurotropica, embora seja muito activo, este veneno não determina maior reacção, nem qualquer destruição de tecido ao nivel da picada (3).

Os venenos bothropicos e os crotalicos nearcticos (sobretudo os norte-americanos), por seu lado, penetram na economia mais lentamente e são absorvidos em grande parte por via lymphatica, de envolta com os proprios productos de

destruição cellular. Sendo especialmente cytolyticas, estas peçonhas dão origem a grande reacção inflammatoria, com gradativa destruição dos tecidos, a partir do ponto em que são inoculadas pelas especies correspondentes.

Dada essa diversidade de mecanismo *é natural que, no envenenamento crotalico sul-americano, se faça a injecção do soro em qualquer ponto do corpo*, de preferencia por via muscular ou intravenosa, de accordo com a gravidade do accidente, facilitando-se, assim, o rapido contacto do especifico com os principios letiferos. Ao invés disso, *nos envenenamentos bothropicos e nos crotalicos norte-americanos, se deve empregar pelo menos uma parte do soro em redor do ponto attingido, formando-se a esse nivel uma verdadeira barragem*, para se delimitar a destruição dos tecidos; deve-se reservar a outra parte para injecção á distancia, afim de se reduzir a acção que sobre os centros vitaes possa exercer a porção do veneno já porventura absorvida. A proposito, tenho verificado que, em casos tratados sem demora, a injecção local do soro, feita em dose apropriada, determina uma cura rapida e sem maiores incidentes.

Repetição das injecções a curtos intervallos

A quantidade de veneno oscilla de especie a especie e, num mesmo exemplar, varia de accordo com a idade, prévia alimentação, frequencia de luctas e outros factores, resultando disso tudo que *nunca se pode determinar previamente e com exactidão a dose de antiveneno que se deve empregar para curar o paciente.*

E' indispensavel, portanto, que, depois de se applicar uma primeira dose em quantidade inversa ao tamanho do paciente, se procure observar com cuidado a marcha dos symptomas. Em geral a primeira injecção determina uma melhora subjectiva e objectiva, que, si a dose não foi sufficiente — o que frequentemente acontece —, dentro em pouco desapparece, voltando então a aggravar-se o estado do paciente.

Assim sendo, é indispensavel que, si em resultado da primeira injecção as melhoras não são definitivas, se procure repetir a mesma dose de soro de tres em tres horas, até que se haja inoculado um volume de soro sufficiente para effectuar a cura completa do caso. Dessa maneira, não somente se pode assegurar uma efficacia de 100% no tratamento especifico, sinão tambem se consegue evitar o desperdicio de soro que resultaria necessariamente, em certos casos, si se procurasse attingir de inicio a dose optima.

Cicatrização das ulceras resultantes de certos envenenamentos

A experiencia tem mostrado, de um lado, que, em resultado de sua intensa acção cytolytica, os venenos bothropicos (neotropicos) e os crotalicos da região nearctica costumam determinar gangrenas mais ou menos extensas em redor dos

pontos picados, sempre que não se recorre ao tratamento especifico, ou quando este não é feito de accordo com os preceitos da technica moderna. Doutro lado, se tem verificado que, em resultado da diminuição da vitalidade dos tecidos affectados, a cicatrização das ulceras, resultantes dessas gangrenas mais ou menos parciaes, é muito demorada e precaria.

Impressionado com esse facto, eu tenho, nesses ultimos annos, recorrido em taes casos ao soro normal secco em applicações locaes. Em todas as observações que tenho feito, o *soro secco tem demonstrado aquelle mesmo rapido effeito cicatrizante que assignalei em um outro trabalho que versava sobre as ulceras atonicas e phagedenicas* (4).

Mesmo em ulceras bastante extensas, resultantes de gangrenas que haviam causado destruições musculares e nervo-vasculares importantes, como num caso de minha recente observação (5), *o pó do soro normal tem estimulado a reacção do organismo e produzido, em um espaço bastante curto, a cicatrização completa da região attingida,* sem necessidade do recurso a enxertos ou outros processos que taes, de effeito mais ou menos demorado.

ABSTRACT

An analysis of the recent statistics on the clinical evolution of cases of snake bites and their response to the specific treatment by antivenins discloses many interesting facts which may be briefly summarized as follows:

1. Snake poisoning is much more severe on children and small animals: this severity is inversely proportional to the size, weight or body mass of the victim. For this reason the volume of antivenin to be given must be as great as the patient be small. Application of this principle has already resulted in the saving of many lives.

2. Of the many empirical treatments, consisting of the application of alcoholic beverages, vegetable infusions and chemical solutions, as resorted to in cases of snake-bite, none seems to be really efficacious. In this respect both alcohol and kerozene must be absolutely condemned.

3. In cases of neurotoxic type of poisoning antivenin must be given intramuscularly or intra-venously so as to come rapidly in contact with the poison principles in the blood or in the tissues. In cases of proteolytic and hemorrhagiparous type of poisoning, otherwise, the injection must be given (in part at least) around the site of the bite so as to prevent the absorption of the poison and reduce the destruction of both tissues and blood; in late cases this must be done together with an injection of the serum given away from the site of the bite.

4. In view of the difficulty encountered in determining the approximate amount of venon a snake is apt to inoculate at a bite it is necessary for the

injection of antivenin to be repeated at three hour intervals so as to ensure the complete neutralization of the poison principles and a 100% efficacy in the treatment. The injection of a very large dose of antivenin at once may represent a waste in many cases such as those in which the amount of poison is not large enough to cause death or serious symptoms.

5. Local application of dried normal serum appears to be the quickest and most economic process for the healing of ulcers as resulting from the necrotic effects of poisons on the external tissues.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Amaral, A. do* — Animaes venenosos do Brasil :36.1930.
2. *Mhaskar, K. S. & Caius, J. F.* — Indian plant remedies used in snake-bite *in* Ind. Med. Res. Mem. (19) :1-96.1931.
3. *Amaral, A. do* — Phylogeny of the rattlesnakes *in* Bull. Antiv. Inst. America III(7) :7.1929; Anales Soc. Cient. Argentina CVII:373.1929.
4. *Amaral, A. do* — Contribuição ao tratamento das ulceras atónicas e fagedénicas *in* Mem. Inst. Butantan I(2) :209-231. Est. XXXIX-LX.1919.
5. *Amaral, A. do* — O sôro secco como cicatrizante das ulceras produzidas pelo veneno bothropico *in* Bol. Soc. Med. Cir. XV(10) :382-395.1931.

(Trabalho das Secções de Ophiologia e Immunologia do Instituto Butantan, terminado em dezembro de 1931 e apresentado á Semana do Laboratorio, Soc. Med. & Cirurgia S. Paulo, janeiro 1932).

O SORO SECCO COMO CICATRIZANTE DAS ULCERAS PRODUZIDAS PELO VENENO BOTHROPICO

POR

AFRANIO DO AMARAL

615.67:612.314.5:616.97

O SORO SECCO COMO CICATRIZANTE DAS ULCERAS PRODUZIDAS PELO VENENO BOTHROPICO

POR

AFRANIO DO AMARAL

Considerações geraes

E' facto sobremodo conhecido de todos aquelles que acompanham de perto a marcha do envenenamento bothropico experimental, ou observam, com o necessario criterio scientifico, successivos casos clinicos de intoxicação pelo veneno de serpentes do genero *Bothrops*, taes como, entre nós, a jararaca (*B. jararaca*), a jararacassú (*B. jararacussu*), a caissaca (*B. atrox*), a urutú (*B. alternata*), a jararaca pintada (*B. neuwiedii*) e a cotiara (*B. cotiara*), que a administração do antiveneno especifico, feita á distancia do ponto picado, de accordo com a pratica corrente, não consegue, em via de regra, evitar completamente a gangrena resultante da acção proteolytica e cytolytica exercida sobre os tecidos circunjacentes á zona attingida. Estudando melhor esta questão, verifiquei que a razão de tal inefficacia do soro em attender os phenomenos locaes do envenenamento bothropico reside na demora do agente therapeutico em chegar em contacto com os tecidos affectados, permittindo dess'arte a acção mais ou menos integral dos principios biochimicos constitutivos da peçonha, no exercicio mesmo de sua affinidade para com os elementos cellulares.

No envenenamento experimental sobre cães, Florencio Gomes (1) já havia verificado que, para salvar todos os exemplares previamente inoculados com a peçonha da jararaca, era mister que o antiveneno, sendo dado por via hypodermica, fosse administrado dentro de uma hora após a inoculação do toxico, o que bem mostra a rapidez da propria acção geral da peçonha sobre o organismo animal. Na sua opinião, em casos semelhantes de envenenamento experimental se poderiam esperar resultados mais seguros com a applicação intravenosa do soro em dose equivalente ao dobro do veneno injectado.

Baseado no estudo analytico de varias centenas de boletins de accidentes bothropicos, communicados ao Instituto por pessoas residentes no interior, e em

muitas observações por mim proprio realizadas, resolvi ha dois annos modificar no particular as instrucções já antiquadas, contidas nas bullas que acompanham as empolas de antivenenos entregues ao consumo, *no sentido de aconselhar a applicação local de uma porção do especifico nos casos de intoxicação bothropica e a injecção de doses inversamente proporcionaes ao tamanho ou peso do paciente.* Dada a importancia que o assumpto offerece para as populações ruraes, não me parece fora de proposito que aproveite esta opportunidade para citar na integra as affirmações por mim feitas sobre o caso em um dos meus ultimos trabalhos:

> "Já desde 1919 eu venho verificando, assim em experiencias de laboratorio, como pela observação de pacientes, que as doses até ha pouco recommendadas pelo Instituto Butantan para o tratamento de accidentes ophidicos em crianças e em certos animaes de pequeno tamanho, eram insufficientes. Por isso mesmo é que nas novas instrucções a serem expedidas pelo Instituto sobre o methodo de tratamento e as doses a empregar em taes casos, aconselhamos, conforme se lê abaixo, *a repetição das injecções em intervallos de duas horas, sempre que o accidente seja grave, e quantidades de antiveneno tanto maiores quanto menores e mais jovens forem as victimas. Assim, nas crianças e nos cães é necessario que se injecte pelo menos uma dose inicial de 40 a 60 cc., desde que, pelo quadro symptomatico, se verifique a gravidade dos casos. Alem disto, é aconselhavel, segundo observações que venho fazendo ha algum tempo, injectar-se em torno do ponto offendido pelo menos uma parte da dose do soro indicada, nos casos de picada pela jararaca e outras serpentes do mesmo genero (Bothrops), a acção necrosante de cujo veneno sobre os tecidos é bem conhecida*" (2).

Envenenamento pelas serpentes

Quasi todas as serpentes são capazes de produzir picadas dolorosas e isto porque são dotadas de pequenos dentes aguçados, dispostos geralmente em 4 fileiras do lado de cima (1 fila maxillar e 1 fila palatino-pterygoidea de cada lado, na maioria dos typos) e 2 do lado de baixo (fila mandibular). Todos esses dentes têm a ponta dirigida para trás, para o fundo da bocca, de sorte a tornar difficil a escapa dos animaes que os ophidios caçam para comer.

A mordedura de qualquer serpente, portanto, costuma produzir lesões dos tegumentos, nelles deixando certos signaes que servem para o diagnostico differencial do typo causador da picada. Acontece, porém, que muitas mordidas são causadas por especies desprovidas de presas ou apparelho inoculador e, pois,

são susceptiveis de sarar rapidamente, mesmo sem qualquer applicação medicamentosa. Sabedores deste facto, os nossos espertos curandeiros exploram a ignorancia do povo, a quem convencem do alto valor de suas mesinhas costumeiras e da verdade mesma de seus milagres repetidos.

Os casos de envenenamento ophidico observados no Brasil são produzidos por especies de Elapideos, representantes da serie proterógiypha, e de Crotalideos, correspondentes á serie solenóglypha. Conforme se tem verificado os accidentes determinados pelos nossos Elapideos, vulgarmente conhecidos pelo nome de "cobras coraes verdadeiras", são absolutamente excepcionaes, devido a varias circunstancias peculiares a elles. De qualquer modo, cumpre dizer que as picadas destas serpentes de typo elapidico, são frequentemente muito graves e caracterizam-se por intensa dor na região attingida, acompanhada de salivação abundante, lacrimejamento, diarrhéa, paresia da zona affectada e asthenia mais ou menos profunda.

De seu lado, as serpentes solenóglyphas brasileiras, que se distinguem logo á primeira vista pela presença de 2 orificios de cada lado do focinho, causam dois typos bem diversos de envenenamento: o crotalico e o bothropico, sem mencionar o lachetico, produzido pela surucutinga (*Lachesis muta*) e que é muito raro.

Os principaes symptomas de envenenamento do typo crotalico, isto é, determinados pela cascavel (*Crotalus terrificus*), são geralmente os seguintes:

Dor local quasi nulla; fraqueza progressiva e rapida; paresia ou paralysia das palpebras, com perturbações da visão, até completa cegueira; impressão de pescoço quebrado (cabeça cahida), devido á paralysia dos musculos cervicaes; vomitos ou, ás vezes, diarrhéa e urinas sanguinolentas (hematuria); pulso fraco e capillar; algidez, principalmente das extremidades; somnolencia profunda e, nos casos graves, morte por parada da respiração.

Os principaes symptomas de envenenamento do typo bothropico, que resulta da picada da jararaca, caissaca, jararacussú, urutú, cotiara e outras especies de *Bothrops*, são em resumo os seguintes:

Dor intensa na região attingida; edema hemorrhagico ascendente, com formação de bolhas (phlyctenas); engorgitamento ganglionar; hemorrhagia pelas mucosas, taes como a da bocca, ouvido e estomago, intestino, rim, etc. ou, nas mulheres, a do utero, acompanhada de suspensão das regras; destruição progressiva dos tecidos mais de perto affectados, com formação de eschara, alcançando os tecidos profundos, e, por vezes, quando a picada attinge os membros, com perda dos segmentos (mãos ou braço, pé ou perna), devida á gangrena extensiva que se installa; finalmente, morte, nos casos mais graves, principalmente observados em crianças e pequenos animaes.

Tratamento dos accidentes ophidicos

O tratamento dos accidentes ophidicos baseia-se na applicação dos antivenenos ou soros especificos e comprehende uma serie de cuidados e medidas que se podem assim resumir:

a) *Primeiros cuidados* — O primeiro cuidado de tratamento dos accidentes ophidicos é transportar o offendido para logar onde possa receber os necessarios soccorros, devendo-se evitar nesse transporte, tanto quanto possivel, grandes abalos para o paciente. Em seguida, deve-se desapertar toda a roupa e collocar o offendido em uma cama ou maca, ou mesmo sobre o sólo, extendido e com a cabeça baixa.

Si o paciente estiver muito abatido, pode-se dar-lhe a beber uma chicara de café quente.

Antes de mais nada, é de toda conveniencia verificar a especie de serpente causadora do accidente, pois esse conhecimento será de grande utilidade na escolha do especifico a empregar.

b) *Escolha do antiveneno a empregar* — Deve-se empregar o soro anti-crotalico nos accidentes de typo crotalico, isto é, determinados pela cascavel: o soro anti-bothropico, nos envenenamentos de typo bothropico, isto é, produzidos pela jararaca, caissaca, jararacussú, urutú, cotiara, etc.; o soro anti-bothropico monovalente, nas picadas pela jararaca, devendo-se reservar o soro mixto ou polyvalente, soro anti-ophidico, para os casos de não se reconhecer a serpente que mordeu.

c) *Opportunidade do tratamento* — A rapidez com que se recorre ao tratamento especifico tem grande influencia sobre o seu resultado e sobre a quantidade de soro a empregar: *quanto mais cedo for injectado o soro, tanto maior a probabilidade de cura e menor a dose necessaria para neutralizar o veneno inoculado.*

Em via de regra, mesmo nos casos graves, a primeira injecção poderá ser coroada de exito completo si for feita em dose sufficiente e dentro das duas primeiras horas após o accidente.

d) *Doses indicadas* — Nos casos de envenenamento de extrema gravidade, ou naquelles em que os symptomas se apresentam rapidamente, conforme succede nas crianças e nos pequenos animaes, deve-se injectar logo 40 ou 60 c.c. de soro; nos de media intensidade, metade destas doses (20 a 30 c.c.); nos benignos, cerca de um terço (10 a 20 c.c.).

Desde que cada empola contém 10 c.c. de soro, é necessario injectar o conteudo de 4 a 6 empolas, nos casos mais graves; 2 a 3 empolas, nos casos medios; 1 a 2 empolas, nos casos benignos.

Para as crianças e os pequenos animaes a dose de soro deve ser sempre maior do que para os adultos e os grandes animaes, isto é, deve ser sempre tanto maior quanto menor for o paciente.

e) *Local da injecção* — Possuindo o soro effeito geral, a injecção póde ser feita por via sub-cutanea (hypodermica) em qualquer parte do corpo, devendo-se, entretanto, preferir região de pelle distensivel e pouco movel, como as costas, no intervallo das espaduas, ou os lados do ventre (flancos). Nos casos de envenenamento do typo bothropico é indicado, porém, injectar-se uma parte da dose em redor do ponto picado, pois assim se circumscreve mais facilmente a destruição dos tecidos.

Nos casos graves e nas crianças e pequenos animaes, a injecção deve ser feita por via venosa, ou peritoneal desde que o calibre das veias seja diminuto. Afim de facilitar-se a eliminação do veneno e a reacção do doente, é necessario que, nos casos graves, alem do soro ou de mistura com elle, se injecte agua physiologica com adrenalina (100 a 250 c.c. de agua physiologica para 1 c.c. de soluto de chlorhydrato de adrenalina a 1:1000). Nos casos de extrema gravidade ou nos que se apresentam com tendencia a collapso é bom fazer tambem injecções de cafeina e estrychnina.

f) *Escolha e preparo da seringa* — Qualquer seringa grande e esterilizavel pode servir para a injecção dos soros anti-peçonhentos.

Antes de se encher com o soro, a seringa deve ser fervida conjunctamente com as agulhas. Para isso, collocam-se seringa e agulhas em uma pequena vasilha com agua em quantidade sufficiente para as cobrir completmente e fervem-se durante 5 a 10 minutos pelo menos. Vasa-se depois cuidadosamente parte da agua, deixando-se esfriar um pouco, antes de retirar a seringa. Esta não deve ser posta na agua já a ferver, porque pode partir, nem deve ser cheia quando ainda quente, porque, alem de ficar sujeita a quebrar, pode coagular o soro.

g) *Modo de encher a seringa* — Para se transvasar o soro, basta quebrar-se a extremidade afilada da empola e aspirar-se o conteudo por meio da seringa.

h) *Preparo da região* — Escolhido o ponto a ser injectado, nas costas ou perto da picada, lava-se cuidadosamente com agua e sabão e um pouco de antiseptico ou, na falta deste, mesmo com aguardente.

i) *Modo de injectar o soro* — Preparado o ponto onde se vai fazer a injecção, trata-se de levantar, com a mão esquerda, a pelle, de modo a formar uma dobra ou cone, em cuja base se implanta uma das agulhas que acompanham a seringa (e que devem tambem ter sido esterilizadas), depois de retirado o pequeno fio metallico que lhe garante o funccionamento.

A agulha deve atravessar completamente a pelle, o que se verifica pela impressão que dá, de estar já com a ponta livre e dentro do tecido subcutaneo.

Retiram-se então as bolhas de ar que porventura tenham ficado no interior da seringa, a qual então se liga á agulha implantada, injectando-se o soro por um movimento de propulsão lento de embolo.

Si a seringa não tem a capacidade sufficiente para injectar de uma só vez toda a dose do soro, deve-se, ao terminar a injecção da primeira quantidade, separar a seringa da agulha e conservar esta implantada para evitar nova picada, inteiramente desnecessaria. Separada a seringa, trata-se de adaptar a ella a outra agulha esterilizada e proceder ao seu enchimento com nova quantidade de soro, findo o que se passa a ligar á agulha já implantada, e assim successivamente.

j) *Cuidados com a seringa* — Depois de occupada, a seringa deve ser cuidadosamente lavada em agua, afim de serem removidos os traços de soro porventura depositados em suas paredes, os quaes, pelo deseccamento, poderiam inutilizal-a completamente.

k) *Cuidados com o paciente* — Terminada a injecção, o paciente deve ser deixado na cama, no mais completo repouso, evitando-se qualquer causa de excitação.

Si a dose injectada é sufficiente e feita em tempo opportuno, as melhoras apresentam-se dentro de 3 a 6 horas. Si, porém, não for sufficiente, nem administrada bastante cedo, é necessario repetir-se a injecção cada 3 ou 6 horas até que se complete a dose necessaria á cura do caso.

Nos accidentes determinados pela cascavel acontece ás vezes que os phenomenos de intoxicação, depois de cederem apparentemente sob a influencia do tratamento, a ponto de darem ao paciente a impressão de cura completa, sobrevêm novamente, com certa intensidade e podem determinar a morte, caso não se faça logo nova injecção de soro. E', pois, necessario, nos envenenamentos de typo crotalico, prolongar a observação por 3 semanas no minimo, ou então administrar, logo no começo, uma grande dóse de antiveneno.

Enquanto estiver sob a influencia da intoxicação, a pessoa picada deve ser mantida em dieta liquida, constituida por leite, caldos, café, chá.

Do segundo para o terceiro dia, caso já tenha melhorado, o paciente deve tomar um purgativo salino brando, como sulfato de sodio ou citrato de magnesio.

l) *Instrucções sobre os soros* — Embora os antivenenos entregues ao consumo pelo Instituto Butantan sejam geralmente concentrados, é frequente formar-se um pequeno precipitado que se deposita sobre a parede ou fundo das empolas. Esse precipitado não indica alteração do producto e representa a parte que não possue effeito therapeutico, de sorte que é preferivel não agitar as empolas antes de ser extravasado o seu conteudo.

Conservados em empolas intactas, ao abrigo da luz e em logar fresco, os soros mantêm suas propriedades curativas por muitos annos, tendo-se verificado no Instituto que, mesmo depois de 25 annos, ainda podem ser empregados. Por

esse motivo é que não se acceitam em devolução os antivenenos entregues ao consumo publico.

Isto quanto ao tratamento scientifico das picadas.

Tratamentos empiricos

E' sabido, porém, que, especialmente entre a classe baixa, muita gente ainda acredita que mordedura de cobra passa com remedios caseiros, cuja base é em via de regra o alcool ou kerozene. Assim, tanto no Brasil, como nos demais paises americanos, é frequente se verem pessoas, picadas por serpentes, procurar beberagens com base de alcool, sendo que nos Estados Unidos, em virtude da lei secca, muitos pretos se fazem propositalmente picar por cobras não venenosas só para terem direito a uma dose de whiskey de que sentem tanta falta... No entanto, experiencias realizadas com todo o rigor scientifico têm demonstrado que o alcool, longe de curar ou siquer facilitar a cura, pelo contrario a difficulta, porque a principio favorece a absorpção do veneno e, mais tarde, em resultado da baixa da pressão sanguinea, retarda a reacção do organismo e a eliminação do toxico.

No que diz com o kerozene, os effeitos observados ainda são mais prejudiciaes. Além de não ter qualquer acção benefica sobre o envenenamento, o kerozene, ingerido nas doses que o povo emprega, complica os symptomas, porque por si só produz uma intoxicação aguda, com destruição do sangue e degeneração do figado.

Ha 2 annos tive ensejo de soccorrer a um trabalhador, recenchegado de Portugal, que, ao ser picado por uma cascavel nos arredores da cidade de São Paulo, foi obrigado a ingerir cerca de meia garrafa de kerozene que lhe administraram os companheiros de trabalho. Apezar da applicação intensiva do antiveneno especifico (soro anti-crotalico), esse paciente não poude reagir, vindo a fallecer no dia seguinte com todos os symptomas de envenenamento pelo kerozene. Ainda ha pouco tempo, tive sob observação uma franzina menina de 7 annos, residente á margem da estrada de São Paulo a Itú e que, depois de um copioso almoço, foi, em certo domingo, picada por uma cascavel que mataram e trouxeram ao Instituto para identificação. Ao examinar o ophidio, dei pela falta do *crepitaculum* (chocalho) e, ao ser notificado da morte da doente, apezar do tratamento especifico, tratei de averiguar o que os parentes da victima haviam feito com esse appendice. Fui informado de que o mesmo havia sido triturado e posto em um copo de kerozene que foi dado a beber á desventurada criança.

Logo depois deste caso, observei um outro de um menino de 12 annos de idade, residente em um velho sitio além do Ypiranga, no municipio de São Paulo, o qual fora mordido por uma cascavel, no momento em que estava trabalhando na roça. Soccorrido pelo pai que conseguiu matar a serpente causadora do accidente, recebeu essa criança como medicação de urgencia uma "boa dose"

de cachaça com alho grande, na crença de ter ingerido um antidoto efficaz. Não havendo naturalmente o remedio produzido o effeito desejado, foi a victima, já em estado grave, trazida ao Instituto Butantan pelo proprio pai que, ao ser inquirido sobre o accidente e a medicação usada, declarou que administrara um calice de pinga com alho, só não tendo augmentado a dose para um copo, por se ter o offendido recusado a ingerir mais, devido aos vomitos que provocara o "remedio". Para fazer face ao envenenamento dessa criança foram necessarias 9 empolas de soro anti-crotalico injectadas por via sub-cutanea, intravenosa e intraperitoneal, de mistura com cerca de meio litro de agua physiologica com adrenalina, seguido de estrychnina e cafeina.

A minha primeira experiencia com tratamentos dessa natureza passou-se ha cerca de nove annos, quando tive conhecimento de um caso de envenenamento ophidico cuja unica "medicação" consistira em couro de jacaré administrado com "pinga e oleo de candeia" (3).

Enquanto não se generalizar o conhecimento das novas instrucções e as doses de antiveneno bothropico continuarem a ser integralmente administradas á distancia da região offendida surgirão novos casos de mutilação mais ou menos extensa, consequente ao empeçonhamento de pessoas ou animaes. Infelizmente, em taes circunstancias, o veneno não se limita a destruir os tecidos por elle directamente affectados, sinão leva alem a sua acção e eterniza, muita vez pela vida do mutilado, o effeito deleterio, antitrophico, de seus principios biochimicos, representado por ulcerações de caracter atonico e resistentes aos tratamentos ordinarios.

Tratamentos usuaes de ulcerações atonicas

No tratamento das ulcerações de caracter torpido, provenientes do envenenamento bothropico, como no das ulceras atonicas em geral, a maioria dos medicos continua, para infelicidade dos doentes, a lançar mão dos recursos da velha antisepsia, representada pelas pulverizações phenoladas de La Tourette e pelo inesgotavel arsenal de pomadas da velha pharmacopéa, desde a de Réclus até a de Unna; só por excepção é que algum mais avisado e moderno recorre ás maçagens de Maylard, ao effluvio electrico de Marquant, á diathermia ou ás applicações de ar quente e de raios ultra-violetas ou aos proprios enxertos de Thiersch e Reverdin, cujo emprego tem, todavia, suas naturaes e frequentes limitações.

Ao ler, logo que ingressei no terreno da sorologia, o excellente manual de Darier (4), fiquei impressionado com a multiplicidade de applicações, ainda não convenientemente exploradas pela clinica, do soro normal como excitador da nutrição geral, da hematogenese e da actividade phagocytaria. Dahi resultou o primeiro ensaio que fiz no anno de 1917, de curar, pelo soro normal equino, uma ulcera atonica da perna de um paciente e, logo depois, um profundo ferimento deformante numa das phalanges de outra pessoa, por signal que ajudante de

carpinteiro em Butantan, havendo o resultado, em ambos os casos, excedido as espectativas mais optimistas. Em seguida a esses dois ensaios procurei aperfeiçoar o methodo e generalizar sua applicação a condições correlatas da necessidade de se estimular a proliferação cellular com intuitos de activar a cicatrização, havendo por final communicado a uma sociedade local o resultado de minhas observações (5).

Para gaudio meu, sinão para honra da sciencia nacional, esse methodo, que tão de perto attendia á economia dos doentes, por ser de facil applicação, de preço pouco elevado e de effeito seguro na grande maioria dos casos, se tem generalizado em nosso meio e tem recebido mesmo o favor de comprovações no estrangeiro, segundo se deprehende, por exemplo, de um artigo (6) publicado, em 1923, pelo eminente collega de Lausanne, Dr. R. Feissly, que assim se manifestou:

> "J'eus l'idée d'essayer à mon tour le traitement du Dr. Amaral, et je fis préparer à l'Institut sérothérapique de Berne la poudre de cheval qui m'était nécessaire.
>
> Le résultat de son application a été ce que je viens de dire; il confirme donc entièrement les observations de mon confrère brésilien, car il est difficile d'invoquer ici une coïncidence entre les dates de l'application de sérum et un processus de réparation spontanée. Il ne me parait pas non plus qu'on puisse attribuer cette cicatrisation rapide, au tulle gras si précieux, de Lumière, car il ne faut pas oublier que mon observation ne fait que s'ajouter aux nombreux cas d'ulcères phagédéniques publiés par le Dr. Amaral, dont l'évolution a été semblable sous l'unique influence du sérum sec."

A proposito, cumpre referir que, por ter o meu trabalho sido publicado em português — conhecido tumulo do pensamento humano — de 1920 a esta parte o processo de tratamento das ulceras pelo soro normal tem sido victima de novos "descobrimentos" por parte de profissionaes de outras paragens, ignorantes de nossa bibliographia scientifica. Para não me alongar em citações, basta dizer que, ha apenas pouco mais de dois annos, surgiu, no conceituado orgam da Associação Medica Norte-Americana, um artigo de dois collegas de Nova York (7) sobre o tratamento de queimaduras por meio de soro normal equino. Embora a idéa não fosse original, conforme accentuei em carta dirigida aos alludidos collegas e ao editor que a publicou em numero ulterior daquelle periodico (J. Amer. Med. Assn. vol. 93, n.º 6, pag. 476, 1929), o processo empregado, que consistiu na applicação local do soro normal em estado liquido e addicionado de 0,35% de cresol como preservativo, é indiscutivelmente inferior ao por mim descripto, isto é, á applicação do soro deseccado em pó e sem addição de qualquer substancia antiseptica, porquanto, nestas condições, a acção do medicamento é muito mais

intensa e prolongada e, pois, mais economica, alem de que a ausencia de preservativo evita qualquer destruição cellular e acção retardante, por minima que seja, sobre a marcha da cicatrização da ferida, ao contrario do que se passa com o uso do soro liquido e cresolado. De qualquer sorte e apezar destes dois inconvenientes apontados, a applicação do soro normal (mesmo liquido e cresolado como no caso em apreço) produz resultados superiores aos de quaesquer outros processos até agora aconselhados no tratamento de queimaduras (e, por extensão, no de outras ulcerações e perdas de tegumento), conforme se deprehende das seguintes conclusões do trabalho de Monteith & Clock ora commentado:

> "1. The method of treating burns with normal horse serum as here described is simple and easily applied. It does not soil bed linen or clothing.
>
> 2. In our hands, this method has yielded far better end-results than any other method that we have employed for the treatment of burns due to fire, hot water or acids.
>
> 3. The important advantages of this method of treating burns are (a) absence of scar tissue; (b) rapidity of formation of new epidermal tissue in all parts of the wound; (c) freedom from pain; (d) prevention of infection, and (e) elimination of toxemia by preventing the absorption of the toxins.
>
> 4. Even when the destruction of tissue involves a large area, the wound becomes covered with sound, healthy tissue and there is no contraction with resulting deformity; splints, traction or skin grafts are not required.
>
> 5. When burns are treated by our method, bacterial growth is inhibited by the cresol in the serum and pus formation is minimized.
>
> 6. When burns of the skin bearing hair are treated with normal horse serum by our method, the denuded area becomes covered with healthy epidermal tissue which again bears hair.
>
> 7. We would emphasize the value of the preliminary bath of warm physiologic solution of sodium chloride. It not only facilitates removal of the devitalized tissue but also prevents absorption of the toxins generated in the burned area.
>
> 8. Normal horse serum containing cresol, when sprayed on the burned area, coagulates the exuding tissue plasma and thus provides the healthy cells with physiologic food, so that the cells can proliferate and form new, healthy epidermal tissue.
>
> 9. The serum should be applied at least twice daily to prevent drying of the tissues in the burned area, which would cause death of the cells.

10. After the normal horse serum has been applied, the wounded surface is protected with rubber tissue, which prevents evaporation and thus insures prolonged action of the serum".

Soro secco e gangrena por envenenamento bothropico

Estas considerações vêm a proposito de um interesante e gravissimo caso de envenenamento bothropico determinado pela jararacassú (*B. jararacussu*) observado na pessoa do Sr. A. K., brasileiro, de 42 annos de idade e residente nesta capital, onde se entrega á profissão de dentista.

O paciente achava-se, no dia 23 de julho p. passado, a passeio no interior do estado, perto da localidade Presidente Epitacio, á margem do rio Paraná, no exercicio, calmo e distrahido de seu predilecto desporto venatorio, quando, ao se baixar para colher algo de sobre o solo, foi picado por uma enorme jararacassú que elle, com grande presença de espirito, conseguiu matar e medir, verificando ter cerca de um metro e meio de comprimento.

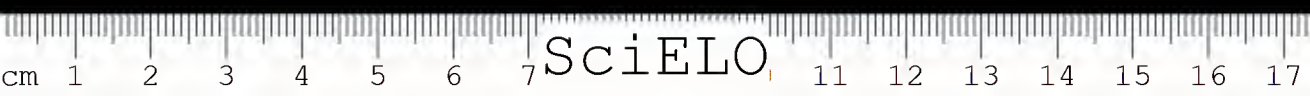
Ambas as presas da serpente attingiram-lhe profundamente os tecidos molles da porção distal da região interna do antebraço direito a cerca de 6 centimetros acima da dobra do punho, causando-lhe intensa dor, e profundos soffrimentos durante longo tempo. Apezar de gravemente empeçonhado, o paciente só poude ser soccorrido cerca de 2 horas mais tarde, quando recebeu o antiveneno bothropico polyvalente. A injecção foi-lhe applicada na região inter-escapular, por via hypodermica e na dose de 3 empolas do especifico, quando, em virtude da gravidade do caso, parecia indicado ter a applicação sido feita por via venosa (ou em redor do ponto picado, conforme julgo preferivel em taes circunstancias) e em dose duas ou tres vezes maior, afim de poder neutralizar o effeito da quantidade de veneno, em excesso da capacidade normal dos tecidos humanos e que medeia por um milligrammo por kilo de peso. Ora, é sabido que a jararacussú pode inocular de vez de 100 a 300 milligrammos de veneno e, portanto, de 30 a 230 milligrammos alem da capacidade de resistencia do organismo. Nestas condições, é indispensavel que nos casos em que se presuma ou se tenha presente uma inoculação completa de peçonha por parte da cobra, se procurem dar ao offendido doses repetidas de soro, até attingir-se a quantidade capaz de fazer face ao excesso de veneno injectado pelo ophidio.

Infelizmente bem poucos são aquelles que vão caçar no interior perfeitamente munidos do remedio protector, de sorte que, sem embargo da constante e generalizada campanha desenvolvida neste sentido pelo Instituto Butantan, ainda de vez em quando occorrem casos como o de que trato no momento.

Continuando a aggravar-se os soffrimentos do paciente, foram-lhe applicadas mais duas empolas do soro especifico, e isto só no dia seguinte, quando já era demasiado tarde para evitar ou siquer remediar o damno causado pelo ophidio. Assim, não é de admirar que, a despeito de todos os esforços e dedicação

dos medicos consultados, a gangrena se houvesse installado extensivamente e em marcha ascendente pelo antebraço e braço até perto da axilla, havendo o edema invadido a propria parede thoracica do lado correspondente, pelo que se chegou a pensar na necessidade urgente de amputação do membro. Felizmente, cinco dias mais tarde a gangrena estava bem delimitada; para facilitar a queda do esphacelo, fez-se necessaria uma pequena intervenção cirurgica que, de seu lado, facilitou a drenagem do pús. Demorando a reacção cicatricial e apresentando a ulceração um caracter pouco satisfactorio, aconselharam os medicos que o paciente volvesse a esta capital onde encontraria melhores recursos para tratar-se. Por esse motivo, veiu elle á minha procura na ultima semana de agosto (um mês após o accidente), quando lhe examinei. Nesse momento a ulceração alongava-se desde o punho até o terço medio do braço pela face interna, estendendo-se até a externa do antebraço, na qual existia então uma faixa, de cerca de cinco centimetros de largura, de tegumento. O exame attento da região revelou ter havido destruição completa dos tendões do pequeno palmar e do cubital anterior, do nervo cubital e da arteria e veias que o acompanham normalmente e lesão parcial do flexor superficial commum e do longo supinador, tudo conforme ficou gravado na photographia que no momento fiz tirar para a necessaria documentação do caso (Fig. 1).

Tratamento — Apezar da extensão formidavel da lesão e da profunda destruição de tecidos, não hesitei em lançar mão de applicações locaes de soro secco, precedidas de lavagens com agua physiologica, em detrimento de quaesquer substancias antisepticas ou pomadas, cujo emprego vae cada vez mais cahindo em desuso, por anti-economico ou mesmo prejudicial aos pacientes. Desde então, tenho feito o curativo duas vezes por semana e protegido a região, quer por meio de uma membrana de gutapercha, quer especialmente por meio de um penso occlusivo de esparadrapo, com o fim de conservar o mais possivel a acção do soro posto em contacto com os tecidos lesados. Ultimamente, a conselho meu, o paciente tem submettido o membro affectado a maçagens manuaes e electricas, com o fim de estimular a cinetica da região, afim de que elle possa voltar ainda a exercer a sua profissão de dentista.

E' bem verdade que elle está avisado da impossibilidade de uma completa *restitutio ad integrum*, em virtude das grandes lesões nervo-vasculares e musculares de que foi victima. Em todo caso é de esperar que, dentro em pouco, a cicatrização da pelle já esteja ultimada e elle possa então submetter-se a uma mechanotherapia mais intensiva para poder retomar os trabalhos de sua profissão. Actualmente a cicatrização da extensa zona ulcerada está quasi completa, conforme se vê na Fig. 2.

ABSTRACT

Application of dried normal serum on an extensive ulceration with deep destruction of skin, muscles, nerve and vessels of the fore-arm (Fig. 1), resulting from the cytotropic, proteolytic and hemolytic effects of the poison of *Bothrops jararacussu* has been followed by a gradual and satisfactory healing of the lesion (Fig. 2) with nearly complete recovery, by the patient under observation, of the motion of his fore-arm and hand.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Gomes, J. Florencio* — Da acção do soro anti-bothropico sobre a intoxicação experimental pelo veneno da *Lachesis lanceolatus* in Ann. Paul. Med. Cir. XI(7):149-158.1920.
2. *Amaral, Afranio do* — Campanhas anti-ophidicas *in* Mem. Inst. Butantan V:213.1930.
3. *Amaral, Afranio do* — Animaes venenosos do Brasil: 39-41 (Secret. Agric. São Paulo) 1931.
4. *Darier, A.* — Vaccins, sérums et ferments dans la pratique journalière. Paris, 1912.
5. *Amaral, Afranio do* — Contribuição ao tratamento das ulceras atónicas e fagedenicas. — Do emprego do sôro normal sêco. Comm. Soc. Med. Cir. São Paulo 16.VI.1919 *in* Ann. Paul. Med. Cir. X(12):284-288.1919.
6. *Feissly, R.* — Contribution à la question du traitement des plaies atones. (Ulcération à bords cyanotiques traitée par le sérum de cheval en applications locales) *in* Schweiz. medizin. Woch. 29:1-6.1923.
7. *Monteith, S. R. & Clock, R. O.* — The treatment of burns with normal horse serum *in* J. Amer. Med. Assn. 92(14):1173-1176.1929.

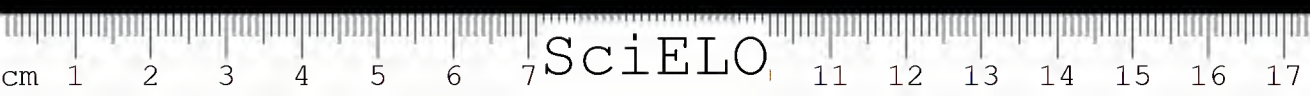
(Trabalho das Secções de Ophiologia e Immunologia do Instituto Butantan, terminado em novembro de 1931 e communicado á Soc. Med. Cirurgia. S. Paulo, 1-XII-1932. Nota in Bol. Soc. Med. Cir. S. Paulo XV (10): 382-395.1931).

Mem. Inst. Butantan
Vol. VI, 1931

Fig. 1

Fig. 2

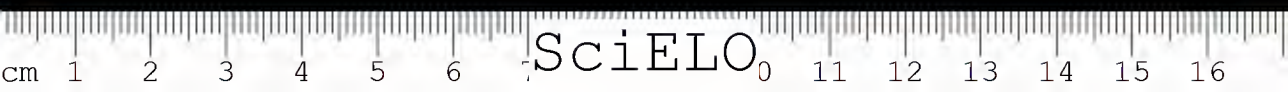
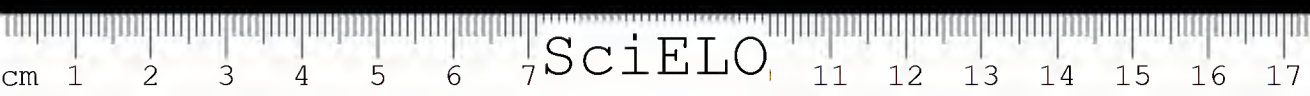
MODERNAS TECHNICAS DE PREPARO DA ANTITOXINA TETANICA

POR

J. LEMOS MONTEIRO E FLAVIO DA FONSECA

612.398.8:616.854

MODERNAS TECHNICAS DE PREPARO DA ANTITOXINA TETANICA

POR

J. LEMOS MONTEIRO E FLAVIO DA FONSECA

Grande tem sido nos ultimos annos o progresso da sorotherapia antitetanica e notavel a excellencia das antitoxinas produzidas pela technica moderna, em relação ás obtidas com os processos menos recentes, o que trouxe como consequencia a progressiva melhora nas estatisticas da therapeutica do tetano.

O progresso observado nos ultimos annos originou-se das verificações basicas de Ramon (1) sobre o augmento do titulo antitoxico do soro de cavallos que apresentavam, accidentalmente, um abcesso no ponto da inoculação da toxina diphterica no decurso da immunização. Procurando estabelecer um processo de immunização em que pudesse ser obtido experimentalmente um resultado identico, este auctor verificou, após multiplos ensaios, que a addição, ao antigeno diphterico, de pó de tapioca esterilizada provocava apparecimento de edema e affluxo leucocytario no ponto de inoculação, acompanhado de lenta absorpção do antigeno, do que resultava producção muito mais intensa de antitoxina.

Applicando esse methodo nos animaes productores de soro antitetanico, verificaram Ramon e Descomby (2) que o teor em antitoxina dos cavallos assim immunizados augmentava tambem de modo notavel, tornando-se esse o processo de escolha para a obtenção de antitoxinas de alto valor.

Glenny, Pope, Waddington e Wallace, em 1926 (3), observaram que os precipitados insoluveis obtidos das toxinas addicionadas de alume de potassio gozam de elevado poder antigenico; Ramon, em 1927 (4), demonstrou a possibilidade de obtenção de antitoxinas tetanicas dotadas de notavel acção neutralizante, por meio de immunização com anatoxina tetanica addicionada de pó de tapioca. Representam taes trabalhos outras tantas contribuições de mui alta valia para o progresso da sorotherapia antitetanica, porquanto desse modo ficava tambem reduzido de muito o prazo necessario á completa immunização dos animaes productores de antitoxina.

Esses resultados deram logar ao apparecimento, na literatura sorologica, de larga copia de artigos, todos tendentes a comprovar e ampliar as verificações fundamentaes que acima citámos.

I

Immunização de cavallos por meio de toxina addicionada de alume de potassio

Acompanhando de perto o progresso realizado no particular, têm sido ensaiadas e estão em vigor no Instituto Butantan as technicas actualmente mais preconizadas para a obtenção das antitoxinas tetanicas, cujos titulos ultrapassam de muito os até ha pouco obtidos.

Representa esta nota a summula dos resultados verificados com a applicação, na 1.ª phase da immunização de cavallos, de anatoxina adsorvida pelo alume de potassio, seguida de inoculações de toxina precipitada por essa mesma substancia.

Além dos resultados obtidos com essa technica, apresentamos tambem os observados com a applicação do methodo já em 1925 (5) aconselhado por Glenny, Pope, Waddington e Wallace, isto é, da instituição de um repouso de um mês que deve ser concedido aos animaes em inicio de immunização antitetanica, repouso que dá em resultado uma elevação notavel do poder antitoxico. Este methodo constitue um precursor da recente technica de Ramon e Lemétayer, vinda á luz em 1931 (6) e baseada na verificação de que os cavallos submettidos um anno antes á vaccinação antitetanica com anatoxina addicionada de tapioca, administrada em duas injecções de 10 c.c. seguidas por intervallo de um mês, forneciam, ao serem definitivamente immunizados, antitoxina de titulo que superava todos os outros processos até então utilizados. Experiencias nesse sentido foram tambem instituidas em Butantan, tendo sido feitas cerca de 250 immunizações preparatorias em cavallos, pela technica actualmente aconselhada.

O quadro seguinte mostra os titulos obtidos em alguns animaes antes e depois de utilizada a technica da addição de alume de potassio a 0gr.,5% aos antigenos tetanicos.

N.° do cavallo	Maior titulo obtido na immunização por anatoxina seguida de toxina pura	Maior titulo obtido após addição de Ogr.,5% de alume á anatoxina e á toxina
501	200 u. a. por c.c.	600 u. a. por c.c.
504	200 u. a. por c.c.	400 u. a. por c.c.
506	200 u. a. por c.c.	400 u. a. por c.c.
510	? u. a. por c.c.	1500 u. a. por c.c.
512	100 u. a. por c.c.	500 u. a. por c.c.
516	350 u. a. por c.c.	900 u. a. por c.c.
518	250 u. a. por c.c.	1000 u. a. por c.c.
520	400 u. a. por c.c.	900 u. a. por c.c.
524	200 u. a. por c.c.	500 u. a. por c.c.
525	150 u. a. por c.c.	800 u. a. por c.c.
527	350 u. a. por c.c.	1400 u. a. por c.c.
528	200 u. a. por c.c.	800 u. a. por c.c.
529	550 u. a. por c.c.	1000 u. a. por c.c.
530	300 u. a. por c.c.	600 u. a. por c.c.

Legenda: u. a. — unidade antitoxica expressa de accordo com o methodo de Rosenau e Anderson.

Segundo se deprehende do quadro acima, dos 14 cavallos em que foi feita a experiencia, todos apresentaram augmento extraordinario do titulo antitoxico, tendo triplicado a media geral dos valores. No caso do cavallo n. 510 não foi estabelecido o limite maximo da dosagem anterior, apenas existindo nos protocollos a verificação de ter o seu sôro doseado 100 u. a..

II

Augmento do poder antitoxico do plasma de animaes submettidos a repouso de um mês no inicio da immunização

Em outra experiencia, destinada a pôr em pratica a technica do repouso no inicio da immunização, foram tomados 2 cavallos novos (ns. 536 e 537), cuja immunização obedeceu á seguinte norma:

50 c.c. anatoxina tetanica + alume de potassio a 1 %
150 c.c. anatoxina tetanica + alume de potassio a 0,5%
300 c.c. anatoxina tetanica + alume de potassio a 0,5%

Estas injecções eram separadas por 8 dias de intervallo.

Após 1 mês de repouso, foi iniciada a immunização com toxina, segundo a tabella abaixo, com inoculações separadas por uma semana de intervallo:

50 c.c. toxina tetanica + alume de potassio a 0,5%
100 c.c. toxina tetanica + alume de potassio a 0,5%
200 c.c. toxina tetanica + alume de potassio a 0,5%
300 c.c. toxina tetanica + alume de potassio a 0,5%
400 c.c. toxina tetanica + alume de potassio a 0,5%

Sangrados 15 dias após a ultima inoculação, verificou-se o titulo de 800 u.a. para o cavallo n. 536 e 1000 u.a. para o de n. 537. Fizeram-se mais 3 sangrias acompanhadas da inoculação de 500 c.c. de toxina e alume, seguida de 15 dias de intervallo, tendo sido os mais altos titulos obtidos o de 1400 u.a. para o n. 536 e o de 1500 u.a. para o n. 537.

O cavallo n. 537, depois do repouso de 5 meses, submettido a reimmunização com 30, 50, 100, 150, 300 e 350 c.c. de toxina + alume de potassio a 0gr., 5% forneceu, 15 dias após a ultima injecção, soro de 1600 u.a..

Os titulos antitoxicos assignalados são representados em Unidades Americanas, de accordo com o methodo de dosagem de Rosenau e Anderson, adoptado entre nós, o qual representa o dobro de Unidades Internacionaes, designação esta ultima acceita pelo Comitê de Hygiene da Liga das Nações e que figura em muitos soros encontrados no commercio. O conhecimento desta distincção é de grande importancia para o medico, em beneficio proprio e do seu doente.

RESUMO

A immunização de 14 cavallos productores de soro antitetanico, a principio com anatoxina + alume de potassio e, em seguida, com toxina + alume de potassio, determinou no titulo antitoxico dos soros grande augmento, cuja media foi de cerca de 3 vezes. A immunização de 2 cavallos novos apenas com 3 injecções de anatoxina + alume, seguidas, após repouso de 1 mês, de inoculações semanaes e crescentes de toxina + alume de potassio, originou titulos de 1400 e 1500 u.a., durando somente 90 dias todo o periodo da immunização. Os titulos antitoxicos são figurados em *unidades americanas* que correspondem ao dobro de *unidades internacionaes*.

ABSTRACT

Two small groups of horses were immunized for the production of tetanus antitoxin following Ramon's tecnic of mixing the antigen with potassium alun so as to retard its absorption. A first group of 14 horses were given first toxoid (anatoxin) + potassium alun and later on toxin + potassium alun with the result that the antitoxic titer of their serum became about three times as strong as at the previous immunization with pure anatoxin and toxin. A second group of 2 horses were given a preparatory series of 3 injections of toxoid + alun and a rest of 1 month, whereupon they were inoculated with weekly and increasing doses of toxin + alun; the titer of their serum attained, respectively, 1400 and 1500 a. u. as expressed in "American units" which are twice as strong as the "International units" and their immunization lasted only 90 days.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Ramon, G.* — Sur la production de l'antitoxine diphtérique *in* C. R. Soc. Biologie XCIII:506.1925; C. R. Acad. Sciences CLXXXI:157.1925.

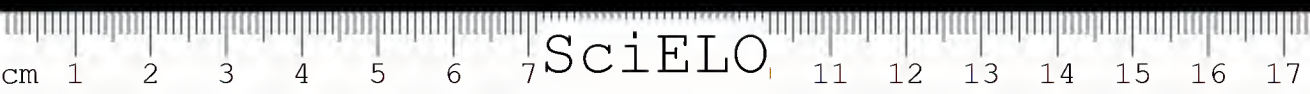
2. *Ramon, G.* & *Descombey, P.* — Sur l'immunisation antitétanique et sur la production de l'antitoxine tétanique — C. R. Soc. Biologie XCIII:508.1925.

3. *Glenny, A. T., Pope, C. G., Waddington, H.* & *Wallace, U.* — XXIII. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum — J. Path. and Bacteriology XXIX:38.1926.

4. *Ramon, G.* — Sur la production des antitoxines — C. R. Acad. des Sciences CLXXXI:157.1925.

5. *Glenny, A. T., Pope, C. G., Waddington, H.* & *Wallace, U.* — Immunological notes. J. Path. and Bacteriology XXVIII:463.1925.

6. *Ramon, G.* & *Lemétayer, E.* — Sur l'aptitude à la production de l'antitoxine tétanique de chevaux antérieurement vaccinés contre le tétanos — C. R. Soc. Biologie CVI(1):21.1931. Sur une méthode de production intensive de l'antitoxine tétanique — C. R. Soc. Biologie CVI(1):23.1931.

(Trabalho da Secção de Immunologia do Instituto Butantan, terminado em dezembro de 1931 e communicado á Semana de Laboratorio da Soc. Med. Cirurgia, S. Paulo, janeiro de 1932).

ESTUDOS SOBRE A UNIDADE DAS FRACÇÕES ALBUMINOSAS DO SORO

POR

DIONYSIO von KLOBUSITZKY

612.398.12:612.124

ESTUDOS SOBRE A UNIDADE DAS FRACÇÕES ALBUMINOSAS DO SORO

POR

DIONYSIO VON KLOBUSITZKY

A maior parte das experiencias sobre soro normal é constituida por trabalhos que se relacionam com compostos albuminosos existentes no soro. A causa do interesse e attenção especial despertados por estes corpos, tanto na actualidade como no passado, — abstrahida sua importancia medica e biologica — reside em primeiro logar nas multiplas difficuldades e impecilhos que se deparam aos investigadores. Essas difficuldades, na maioria, podem ser attribuidas a uma causa unica, isto é, ao enorme volume da molecula e ao consequente estado colloidal destes corpos. O excessivo peso molecular explica o facto de não ser conhecida, até a epoca presente, nem mesmo de modo approximado, a constituição chimica dos corpos albuminosos; sua classificação ou identificação, destituida de base chimica systematica, apoia-se em outras propriedades, até mesmo na procedencia anatomica, o que nos parece ainda mais deficiente, sob o ponto de vista scientifico. E' mais facil approximar-se da precisão exigida pelo espirito das sciencias naturaes por meio da verificação das propriedades physico-chimicas, devendo-se, porém, ter constantemente presente a noção de que numa identificação obtida á custa de um processo indirecto como este não basta a concordancia de uma unica constante physico-chimica para se concluir que dois corpos tambem não são diversos quanto ás suas propriedades, até mesmo na procedencia anatomica, o que nos parece ainda mais varias constantes physico-chimicas, só sendo possivel affirmar com alguma probabilidade de acerto a identidade chimica dos dois corpos quando não houver divergencia essencial. Seria igualmente erroneo seguir o caminho contrario, isto é, comprehender como identicos corpos dotados de propriedades physico-chimicas muito differentes.

A incerteza ainda hoje reinante em sorologia relativamente ás relações de parentesco chimico porventura existentes entre os compostos albuminosos do

soro que apresentam estabilidade variavel em relação a saes neutros, tem por causa principal o facto de serem os resultados de pesquisas physico-chimicas, ora levados em consideração demasiada, ora desprezados. A validade do grupamento dos compostos albuminosos baseados nos varios methodos de floculação salina é questão ainda não resolvida, não se sabendo si se trata de estabilidade variavel das mesmas fracções ou de modificações de um mesmo composto albuminoso ou então si exprimem realmente a existencia de corpos perfeitamente distinctos, sob o ponto de vista chimico, que, no maximo, tenham origem biologica commum.

No presente trabalho propomo-nos a esclarecer este problema, baseado em parte na literatura chimica e physico-chimica já existente e em parte em nossas proprias experiencias, pesquisando o assumpto tão completamente quanto nos permittirem os dados de que dispomos.

Passando revista á historia da sorologia normal, verificaremos que até a primeira metade do seculo XIX apenas ha noticia de um corpo albuminoso, denominado seralbumina. Foi Liebig, o notavel chimico alemão, o primeiro a observar que a addição de algumas gottas de acido acetico ao soro dava logar a uma turvação ligeira, mas sem duvida devida á albumina. Preoccupadissimo com outros estudos, não teve Liebig occasião de dedicar maior attenção a esta observação, tendo, todavia, publicado suas experiencias, despertando a curiosidade de Zimmermann sobre o problema. Este, em 1846, não só repetiu os trabalhos de Liebig, como tambem os ampliou, tendo filtrado o precipitado, diluido fortemente o soro clareado em agua destillada e deixado longo tempo em repouso, depois do que verificou apparecer ainda no soro nova turvação.

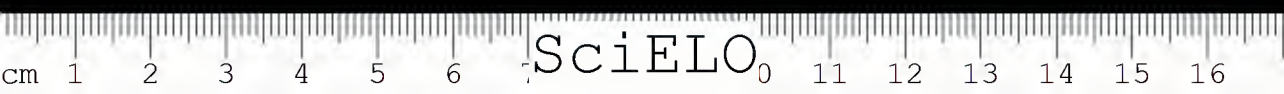
Os trabalhos dos dois pesquisadores não tiveram, porém, repercussão, o que determinou que o medico escandinavo Panum, em 1851, redescrevesse esse phenomeno, dando-o como novo. Segundo confessa, fez a observação por acaso, juntando pequena quantidade de soro a um vidro com agua, surprehendendo-se ao ver que o conteúdo se turvava, dando deposito amarello esbranquiçado. No fim de 24 horas filtrou o deposito facilmente, verificando ser elle soluvel em alcali diluido, acido acetico diluido e bicarbonato de sodio, ao passo que se mostrava insoluvel em alcool, ether e agua destillada. Concluiu, pela consistencia do deposito e pelas propriedades de solubilidade, tratar-se seguramente de um composto albuminoso ainda desconhecido. Não externou a principio um juizo preciso sobre a natureza desse composto albuminoso, considerando varias possibilidades, como a albumina de Mulder, então conhecida por bioxydo de proteina, o albuminato de sodio, a caseina. Mais tarde, baseado em pesquisas mais apropriadas, concluiu tratar-se de uma qualquer modificação da albumina, dando certeza de ser um composto independente, ao qual chamou sero-caseina (4). Panum determinou, ao mesmo tempo, que a quantidade de precipitado de um soro diluido augmenta consideravelmente quando se acidifica a diluição,

quer pela addição de algumas gottas de acido acetico, quer fazendo passar por elle uma corrente de CO^2.

Este phenomeno foi observado e descripto quasi ao mesmo tempo por Scherer e Denis (5) que, completando e controlando os trabalhos do ultimo relativos ás albuminas vegetaes, applicaram essas verificações ao soro. A descoberta de Panum foi em primeiro logar examinada por Schmidt, que lhe ampliou as pesquisas, verificando que o precipitado se redissolve quando o anhydrido carbonico (CO^2) é expulsado por um gas inerte, como o azotico. Apoiando-se na opinião de Lehmann (7), tomou Schmidt esta albumina por globulina de Berzelius (Berzelius deu o nome de globulina á albumina dissolvida, de caracter albuminoide, extrahida por pressão do coagulo sanguineo (8)), dando-lhe o nome de substancia fibrinoplastica, para exprimir a relação, na sua opinião existente, entre esta albumina e a formação da fibrina.

Alguns annos mais tarde, verificou Kuehne (9), ao controlar os trabalhos de Panum, que os corpos albuminosos obtidos com o processo deste nenhum papel representam na formação da fibrina, sendo, portanto, completamente erradas as denominações de corpos albuminosos de Berzelius ou substancia fibrino-plastica. Kuehne tinha os corpos albuminosos precipitaveis pelo anhydrido carbonico e pelo acido acetico na conta de duas fracções diversas, recommendando para o primeiro a designação de globulina ou paraglobulina e para o ultimo a de albuminato de sodio. Interpretação identica foi a de Eichwald (10), que dividiu os corpos albuminosos do soro em tres grupos, distinguindo a serocaseina, a seroglobulina e a seralbumina, e acceitando, portanto, tal como Kuehne, duas fracções de globulina. O proprio Panum adoptou o ponto de vista unitario em relação ás fracções de globulina, alliando-se mais tarde á sua interpretação Heynsius (11), Bruecke (12) e mesmo Kuehne. Conseguiram os citados auctores demonstrar, por um lado, que muitos dos casos de formação de fibrina no soro correm por conta de impurezas e que o soro puro não contem substancia geradora de fibrina; e, por outro lado, que a pesquisa das restantes propriedades (principalmente de solubilidade) da paraglobulina de Kuhne e do albuminato de sodio não revelava entre os dois differenças essenciaes, o que os levou a considerar a globulina como substancia una.

Os trabalhos assim originados e os debates delles decorrentes despertaram logo o interesse por essa fracção labil do soro, determinando na literatura o apparecimento de um numero sempre crescente de trabalhos sobre este assumpto. Dos trabalhos mais antigos só consideramos, porém, necessario citar os que apresentarem importancia basica para o ponto de vista hoje acceito.

Entre os ultimos figura o trabalho de Heynsius, que, em sua communicação acima citada, demonstrou não ser possivel, pelo processo de Panum, separar do soro todas as substancias que não apresentem caracter albuminoso, ficando sempre uma parte, precipitavel pelo chloreto de sodio saturado. Considerou as

duas fracções como uma unica, descrevendo-a sob o nome de globulina. Digno de nota é tambem o trabalho de Weyl (13), não só porque apresentou o primeiro processo de purificação da albumina de Panum, como tambem porque originou o nome, hoje de emprego generalizado, de seroglobulina, dado a essa albumina. Weyl fora discipulo de Hoppe-Seyler (14), que denominava globulinas a todos os corpos albuminoides que se precipitam á diluição com agua destillada, voltando a dissolver-se em solutos alcalinos neutros.

E' dessa epoca (1870-1880) que datam os methodos ainda hoje applicados na separação das globulinas e albuminas. Em 1878 Hammarsten (15) introduziu, para a precipitação da globulina pelo sal, a solução saturada de sulfato de magnesio e, oito annos mais tarde, publicou Kauder (16) as experiencias de Hofmeister sobre o fraccionamento pelo sulfato de ammonio, processo este que constituiu o ponto de partida para as numerosas pesquisas emprehendidas por um grupo de investigadores, os quaes proseguiram no fraccionamento da seroglobulina.

Mais um adiantamento na pesquisa da globulina foi a verificação de que pela dialyse é precipitada apenas uma parte da mesma com sulfato de ammonio parcialmente saturado, ou com sulfato de magnesio saturado, de maneira que a insolubilidade na agua, considerada propriedade caracteristica da globulina, é observada somente numa parte della (Hammarsten (15), Burckhardt (17), Marcus (18), etc.). Hofmeister denominou euglobulina a parte precipitada pela dialyse e pseudoglobulina a parte soluvel. Hammarsten accrescentou, ás duas fracções que se podem precipitar com o minimo de 33% e o maximo de 50% de soluto de sulfato de ammonia saturado, uma terceira, a fibrinoglobulina, nome pelo qual se comprehende o corpo albuminoso residual das soluções de fibrinogeno terminada a formação da fibrina. Deu-se-lhe o nome de fibrinoglobulina por possuir as propriedades do fibrinogeno (isto é, ser precipitavel com 28-33% de soluto de sulfato de ammonia), assemelhando-se, porém, mais á globulina, quanto a não formar fibrina.

A classificação indicada por Hofmeister determinou a separação das globulinas em grupos distinctos. A divisão mais generalizada comprehende — não inclusa a fibrinoglobulina — tres grupos (Doerr-Berger (20), Halliburton (21), Kimura (22), Porges-Spiro (23), etc.). O primeiro, constituido pela parte precipitavel em 30-36% de soluto de sulfato de ammonio saturado; o segundo, em 37-43% e o terceiro, em 44-50% do mesmo soluto. A primeira parte corresponde approximadamente á euglobulina precipitada pela dialyse; a segunda e a terceira differenciam-se ordinariamente por pseudoglobulina I e pseudoglobulina II. Alguns auctores, entre elles B. Burckhardt (17), admittem ainda como grupo distincto a parte precipitada pela passagem da corrente de anhydrido carbonico ou em soluto de sulfato de ammonio saturado a 30%, denominando-a paraglobulina. Existiriam, portanto, quatro especies de globulina, a saber: para-

globulina, precipitavel por diluição, corrente de CO^2 ou em 30% de soluto saturado de sulfato de ammonio; euglobulina, precipitavel pela dialyse ou em 30-36% de sulfato de ammonio; pseudoglobulina I, precipitivel em 37-43% de sulfato de ammonio saturado e, finalmente, pseudoglobulina II, precipitavel em 44-50% de sulfato de ammonio ou em soluto de sulfato de magnesio saturado (reacção neutra).

Essa divergencia do primitivo conceito monistico de Panum não se restringiu ás globulinas, pois no decorrer do tempo um numero sempre crescente de pesquisadores pôs em duvida tambem a unidade da seralbumina. O primeiro a adoptar a classificação das seralbuminas em grupos foi Halliburton (21). Chegou á conclusão de que na seralbumina crystallizada pelo methodo de Gruber, quanto a seu comportamento na coagulação pela calor, se podem distinguir tres grupos: seralbuminas Alpha, Beta e Gamma, coagulando respectivamente a 70-73°C, 76-78°C e 82-85°C. Hoje não podemos mais admittir como exactos os resultados de Halliburton, visto como em sua epoca não existia ainda o processo da dialyse, pelo qual se obtêm solutos albuminosos completamente livres de sal e o sal exerce influencia consideravel sobre a temperatura de coagulação. A unidade da seralbumina hoje em dia é contestada, não em face das experiencias de Halliburton, mas sobretudo pela observação de que é impossivel quantitativamente crystallizar-se a seralbumina. Este corpo assemelha-se á ovalbumina, isto é, póde-se obter a crystallização de uma parte apenas, ou sejam no maximo 40% do material primitivo, segundo as experiencias de Robertson (24). Dahi a discordancia sobre si a seralbumina crystallizavel é ou não, sob o ponto de vista chimico, identica á não crystallizavel.

Ao lado dessas duas questões, a unidade da seralbumina e a da seroglobulina, surgiu ha cerca de 10 ou 15 annos uma terceira, sobre a possibilidade da transformação da albumina em globulina ou vice-versa, na corrente sanguinea ou *in vitro*. No decurso de experiencias clinicas, taes como pesquisas de immunidade, fez-se frequentemente a observação de que a quantidade do corpo albuminoso, que pelo seu comportamento na floculação de sulfato de magnesio ou sulfato de ammonio deve ser incluido entre as globulinas, augmenta consideravelmente. Em parte dos casos [Loebner (25), Galehr (26), Gussio (27)] dá-se esse accrescimo de globulina sem o augmento do conteudo total de albumina. Seria, portanto, natural a supposição de que nesses casos a albumina se converte em globulina, dentro da corrente do sangue. As analyses chimicas provam, como veremos, que as globulinas e as albuminas são corpos albuminosos distinctos. E', pois, de importancia capital a questão da transformação das albuminas em globulinas, pelo que tratarei desse assumpto em primeiro logar.

— O modo mais racional de encarar a questão é começar pela comparação das experiencias physicas e physico-chimicas relativas á albumina e á globulina, pois esse processo nos permitte determinar immediatamente si a albumina e a

globulina são apenas modificações do mesmo corpo albuminoso ou si realmente constituem corpos distinctos sob todos os pontos de vista.

Desejo ainda fazer notar que se trata, sempre que não houver indicação em contrario, de corpos albuminosos obtidos de sangue de cavallo, entendendo-se por globulina sempre a globulina soluvel em agua, isto é, a mistura das pseudoglobulinas I e II.

As analyses chimicas — conforme se evidencia pela tabella I — não são, infelizmente, numerosas, nem recentes, porém, visto como os resultados coincidem exactamente, podemos consideral-os positivos.

TABELLA I

Composição porcentual dos corpos albuminosos

	C	H	N	S	O	Autor
Seroglobulina.	52,71	7,01	15,85	1,11	23,32	Hammarsten (28)
Seralbumina	53,04	7,10	15,71	1,86	22,29	Michel (29)
Seralbumina	53,05	6,85	16,04	1,71	22,29	Starke (30)
Seralbumina crystallizada .	53,06	7,05	15,69	1,89	22,31	Maximowitsch (31)

Pela comparação dos dados verificamos primeiramente que a composição da parte crystallizavel da seralbumina coincide com a da parte não crystallizavel.

Confrontando os resultados relativos á globulina e á albumina, encontra-se differença apenas quanto ao teor de enxofre, o qual está seguramente alem do limite dos erros analyticos.

Uma notavel differença entre a globulina e a albumina foi encontrada tambem por auctores que examinaram o conteudo de acido aminado desses dois corpos. A tabella abaixo é constituida pelos resultados de auctores diversos, porque o isolamento dos varios acidos aminados é um processo tão difficil e moroso que torna quasi impossivel a determinação numa substancia albuminosa de mais de um ou dois desses corpos.

TABELLA II

Porcentagem de acido aminado contido nos corpos albuminosos

Acido aminado	Seroglobulina	Seralbumina	Auctores
Glycocolla	3.5	0.0	
Alanina	2.2	2.7	
Valina	traços	?	
Leucina	18.7	20.0	
Phenylalanina . . .	3.8	3.1	
Tyrosina.	2.5	2.1	Abderhalden (32) (35)
Serina	0.0	0.6	Abderhalden e
Cystina	1.5	2.5	Samuely (33)
Prolina	2.8	1.0	Moerner (34)
Acido asparaginico .	2.5	3.1	
Acido glutaminico .	8.5	7.7	
Histidina.	2.8	3.4	
Arginina.	3.95	4.9	
Lysina	8.95	13.2	

Em vista, não só de serem os resultados apresentados por auctores diversos, mas terem estes tambem trabalhado com methodos differentes, deve-se attribuir importancia somente a uma divergencia pronunciada. Ha quatro pontos de discordancia que se devem considerar: 1. A globulina contem glycocolla, ao passo

que na albumina este acido, o mais commum dos acidos aminados, não se encontra em absoluto. 2. A globulina contem muito menos cystina do que a albumina, o que está de accordo com os resultados das analyses elementares, pois tanto a globulina como a albumina só contêm enxofre em forma de cystina [Mörner (36)]. 3. A seralbumina é muito mais pobre em prolina do que a soroglobulina. 4. A globulina contem 30% menos lysina que a albumina. Esta ultima indicação foi confirmada pelas experiencias em que era determinada apenas a quantidade do nitrogenio que apparecia em diversas ligações [Kimura (22), Thomas e Lock (23)].

Alem disso, verificou-se ainda que na albumina ha mais nitrogenio titulavel com formol, segundo Sörensen (38), do que na globulina, pois o quociente do nitrogenio total e do nitrogenio titulavel com formol é na primeira 13, na segunda 21 [Obermayer e Wilhelm (39)].

Diversos pesquisadores estudaram a questão da fixação de halogenio e calcio desses corpos albuminosos, indicando suas experiencias que deve existir uma differença chimica entre soroglobulina e soroalbumina. A globulina, por exemplo, pode ligar cerca de 25% menos iodo do que a albumina [Blum (40)]. Blum e Strauss (41) mostraram que ha differença, não só relativamente á quantidade total do iodo combinado, mas tambem quanto á distribuição do iodo. No caso de iodização completa (em meios alcalinos), a soroglobulina liga 8,3% de iodo, dos quaes 6,64% passam para o annel de tyrosina e 1,66% tomam o logar de um hydrogenio do grupo NH^2. Na albumina a quantidade total de iodo é de 8,96%, sendo 2,23%, quasi 50% mais do que na globulina, ligados ao grupo NH^2. Quanto á fixação de calcio, Csapó e Faubl (42) verificaram que 100 grs. de seroglobulina podem ligar 37,5 mgrs. e 100 grs. de seralbumina 78,0 mgrs. de calcio, no maximo.

Relativamente ao peso molecular, podem-se considerar como os mais exactos os resultados de Svedberg e Sjögren (43), que usaram nas suas experiencias o ultracentrifugador de Svedberg (44). Segundo as observações dos citados auctores, o peso molecular de seralbumina com pH 4,8 obtido com soluto tampão, é de 67 500, o de seroglobulina, com pH de 5,5, de 103 800.

Ha differença entre os corpos albuminoides tambem quanto á temperatura de coagulação. A temperatura de coagulação maxima de seroglobulina contendo 5-10% de chloreto de sodio, segundo verificação de Hammarsten (45), é de 75°C; a da albumina, nas mesmas condições, é de 85°C. Spiegel-Adolf (46) observou que a seroglobulina coagulada pelo calor perde definitivamente a solubilidade na agua, o que não se dá com a seralbumina.

Determinou-se tambem por repetidas vezes a capacidade rotativa optica desses dois corpos albuminosos. Os resultados, entretanto, são contradictorios, devido á difficuldade da obtenção de solutos perfeitamente homogeneos, transparentes. Só soluções fortemente diluidas, de 2-3%, são bastante homogeneas para se poderem usar na determinação da capacidade rotativa. A rotação ma-

xima de taes soluções é de 1-2°, o que naturalmente não permitte uma leitura exacta, podendo, pois, occorrer graves erros. Das medições recentes as mais precisas parecem ser as de Hafner (47), que determinou a rotação a 20,5°C, á luz vermelha, amarella, verde e azul. Segundo suas indicações, a differença da capacidade rotativa especifica á luz azul e á luz vermelha é, na seroglobulina, 78°,5, o quociente sendo de 2,1, ao passo que na seralbumina essa differença é de 66°,5 e o quociente 2,3.

A refracção da globulina é tambem mais intensa do que a da albumina, conforme demonstrou Schretter (48). Em relação á absorpção, Svedberg e Sjögren provaram não ser igual nos dois corpos albuminosos, visto como a curva do coefficiente de absorpção da globulina é muito mais ascendente do que a da albumina. Tratando-se de globulina, os coefficientes de absorpção maximo e minimo, isto é, o valor do log $1/1^1$ era, respectivamente, 1,35 e 0,63, enquanto para a albumina era de 0,68 e 0,45.

O facto, ha muito conhecido, de que esses dois corpos differem consideravelmente tambem pelos seus pontos isoelectricos, foi ultimamente confirmado por Pauli e Valkó (49), que fizeram as determinações em corpos albuminosos electrodialysados, sendo sua pureza controlada com repetidas medições de conductividade. Segundo estes auctores, o ponto isoelectrico da globulina corresponde ao pH 5,5, o da albumina ao pH 4,99.

Relativamente á conductividade especifica, concentração dos iões de hydrogenio, condições de dissociação, viscosidade e comportamento da globulina e da albumina para com saes neutros, os quadros abaixo apresentam os resultados por mim obtidos. Os dados referem-se, quando não houver indicação especial, a solutos absolutamente livres de sal, obtidos pela electrodialyse (50).

TABELLA III

Conductividade especifica dos corpos albuminosos

	Concentração percentual	Conductividade reciproca	C_H
Pseudoglobulina	1,91	$1,90.10^{-6}$	$8,90.10^{-7}$
Pseudoglobulina	2,77	$3,26.10^{-6}$	$1,09.10^{-6}$
Albumina do soro	1,72	$3,42.10^{-6}$	$8,12.10^{-6}$
Albumina do soro	2,77	$3,98.10^{-6}$	$9,24.10^{-6}$

TABELLA IV

Viscosidade relativa das substancias albuminosas do soro (a 25°C)

	Concentração percentual	
Pseudoglobulina	1	1,0908
Pseudoglobulina	2	1,1886
Albumina do soro	1	1,0590
Albumina do soro	2	1,1139

Ha uma differença bem pronunciada entre os dois corpos albuminosos quanto ás constantes de dissociação calculadas pela conductividade, velocidade de movimento, concentração dos iões de hydrogenio e concentração molecular, pois a globulina é mais fortemente dissociada numa solução a 3%, correspondendo a parte dissociada (*) a mais de 80% da concentração total.

Sendo a concentração superior ou inferior a 3%, a dissolução (percentual) diminue; assim, p. ex., numa solução de 0,95% são dissociados apenas 34% e 55% numa solução de 5,49%, ao passo que na albumina do soro a diminuição está em razão directa do augmento da concentração total. Albumina de soro a 0,49% dissocia 43%; a 1,72%, 20% e a 3.33%, pouco menos de 15%. Quanto á diversa sensibilidade em relação a soluções salinas neutras posso estabelecer o seguinte (51): para se produzir numa solução albuminosa constituida por euglobulina e pseudo-globulina e contendo 0,9% de NaCl (cuja concentração era graduada de 3,69 a 5,39%, por meio de 2,5 de soluções salinas normaes, em temperatura ambiente, dentro de uma hora), uma turvação filtravel, são precisos 2,2 cc. de n/30 HNO^3 ou HCl, usando-se Na^2SO^4 0,0, NH^4SO^4 0,3, NaCl 0,5 e $MgSO^4$.

(*) Os calculos são baseados na theoria de Pauli, da dissociação dos corpos albuminosos. A concentração dos iões de hydrogenio foi considerada como causada totalmente pelas partes ionizadas e a quantidade dos iões ampholyticos calculada por meio da formula $A - + A + = \frac{K''.1000}{10 + 10}$, sendo K'' = K-K'. 10 = velocidade de movimento do ião de albumina. $K' = \frac{C_H\ 360.}{1000}$ 360 = somma da velocidade de movimento do ião de hydrogenio (350) com a do ião de albumina (10).

Experiencias feitas pelo mesmo methodo com albuminas de soro mostraram que Na^2SO^4 flocula sem addicionamento de acido, NaCl após accrescimo de 0,6 $(NH^4)^2SO^4$ de 1,8 cc., ao passo que que $MgSO^4$ era ainda inactivo ao addicionamento de 3,0 cc. de acido.

Após os dados acima, que indicam claramente a diversidade, sob todos os pontos de vista, da albumina e da globulina do soro, consideremos os factos experimentalmente provados e geralmente apontados como indicios da unicidade dos dois corpos albuminosos.

Segundo Moll (52), um dos primeiros pesquisadores que procurou provar a identidade da albumina com a globulina, tanto os clinicos, como os theoristas, fundam suas affirmações em que ou a albumina é mais labil para com saes neutros, ou a chamada euglobulina é soluvel em agua. A alterada sensibilidade da albumina para com os saes neutros não pode, entretanto, constituir argumento contra as determinações chimicas, physicas e physico-chimicas, visto depender a floculação pelos saes de um colloide, em primeiro logar, do grau da dispersão. Quanto mais dividido for um colloide lyophilo, tanto maiores devem ser as concentrações do sal afim de ser destabilizado. Si bem que não conheçamos ainda a sensibilidade do mecanismo da actuação do sal, está fóra de duvida que ao menos parcialmente se baseia na deshydratação, isto é, na subtracção do meio soluvel, ou seja da agua. Quanto mais fraccionado for o corpo albuminoso, maior é sua superficie, *ceteris paribus* a energia superficial com que fixa a agua, e tanto mais difficil se torna a deshydratação. O facto, porém, de a albumina destabilizar-se a qualquer intervenção pela acção de concentrações salinas menores do que as geralmente usadas ou antes de qualquer intervenção, indica apenas que na sua dispersão occorreu alguma alteração, isto é, alguma impureza. A floculação do sal não é, de resto, um methodo perfeito para separação das globulinas e albuminas, por ser muito provavel que á addição de um sal, p. ex., sulfato de ammonio meio saturado, por maior que seja o cuidado empregado, se instabilize uma parte de albumina, ficando ao mesmo tempo uma pequena quantidade de globulina em solução. Esta circunstancia, a meu ver, explica os pequenos erros de analyse. Posso provar esta minha affirmação pelo seguinte: é da natureza dos corpos colloidaes que o tamanho das partes dispersadas, mesmo quando nada influe sobre a solução, se altere constantemente, dentro de certos limites. E', portanto, perfeitamente plausivel que numa solução de globulinas e albuminas haja tambem particulas de globulina que no momento de ser addicionado o sal sejam mais finamente dispersadas do que a media geral, podendo simultaneamente existir na solução particulas de albumina cujo grau de dispersão seja tambem menor do que o da maioria das particulas de albumina. Addicionando-se a um soro uma concentração salina que é boa concentração de limiar para instabilizar a globulina, as partes de globulina finamente dispersadas não se destabilizam, mas sim as particulas de albumina mais grosseiramente dispersadas. A concentração salina

necessaria á instabilização determina apenas o grau de dispersão. E', entretanto, erroneo concluir-se que a diminuida estabilidade é indicio de uma transformação chimica. Na floculação com sulfato de ammonio devemos ainda levar em consideração o modo de preparar a solução de $(NH^4)^2 SO^2$. O $(NH^4)SO^4$ decompõe-se ao calor (a solução acidifica), podendo-se, pois, considerar somente os resultados obtidos com soluções saturadas em temperatura ambiente.

As experiencias de Fanconi (53) provaram cabalmente que é erro acreditar-se numa transformação da albumina só pelo facto de se destabilizar com maior facilidade. Este auctor conseguiu preparar globulina artificial com uma parte de albumina obtida de soro de sangue, pelo methodo de Moll (52) modificado por Ruppel (54), e que consiste essencialmente na alcalinização. Pela comparação de suas propriedades physicas com as da albumina preparada com o mesmo soro e com a globulina natural, verificou que eram iguaes ás da globulina natural somente quanto á floculação de sulfato de ammonio, sendo as demais propriedades diversas das da globulina natural e semelhantes ás da albumina.

Alguns auctores relatam casos de transformação da albumina em globulina, nos quaes a albumina floculada era sujeita a qualquer influencia, p. ex., por meio de acidos gordurosos [Jarisch (55) e Katsumura (56)] ou sendo electrodialysada a 60°C [Gutzeit (57) etc.] (58). Julgamos desnecessario provar que por tão sensiveis influencias são alterados, não só a dispersibilidade, mas tambem outras propriedades dos corpos albuminosos. A circunstancia de não terem os auctores observado sinão a alteração da precipitação é devida ao facto de não haverem examinado outras propriedades da "albumina convertida".

Tambem os casos, bastante frequentes, de augmento da globulina *in vivo* (molestias infectuosas, inanição, immunização, irradiações, etc.) ficou em parte provado que são motivados unicamente pelo augmento do grau de dispersão [Knipping e Kowitz (59)]. Tambem nos casos em que — como, p. ex., num certo estado das doenças infectuosas — existe de facto um augmento de globulina, isso não se traduz necessariamente por uma transformação da albumina, pois é muito mais logica a explicação de que nesses casos as cellulas do organismo — por um motivo que ainda desconhecemos — synthetizam e fazem passar para a corrente sanguinea maior quantidade de globulina do que em condições physiologicas.

Em resumo, posso determinar que a albumina e a globulina são corpos albuminosos chimica e physico-chimicamente diversos e que em absoluto não se convertem um no outro, quer *in vitro*, quer *in vivo*, sendo erroneas todas as conclusões nesse sentido, por se basearem, ou em resultados experimentaes que permitem uma conclusão apenas sobre a modificação do grau de dispersão, ou em experiencias nas quaes a molecula soffrera alguma alteração profunda.

A questão da identidade das albuminas de soro crystallizavel e não crystallizavel não pode ainda ser resolvida de modo satisfactorio, por não dispormos por ora de resultados comparativos precisos sobre albumina crystallizada e não crystallizada preparadas do mesmo soro. As analyses chimicas de Maximovitsch a que acima me referi não indicam differença alguma entre as duas modificações da albumina. Alem disso, o facto de a albumina do soro, ao contrario da hemoglobina, só se crystallizar na presença de uma consideravel quantidade de sal e de serem as formas de crystaes muito differentes, indica que a albumina do soro crystallizada não é uma substancia pura, mas forma com o sal qualquer combinação, provavelmente de adsorpção. E' por esse motivo que nessa questão não posso attribuir importancia á crystallização. As experiencias feitas com a crystallização [Wichmann (60), Gürber (61), Michel (62)] não deram resultados regulares, não constituindo prova para a pluralidade da albumina do soro. As analyses hoje á nossa disposição, determinações physico-chimicas, etc., ao contrario, evidenciam a unidade da albumina.

Seguindo o programma estabelecido, trataremos agora da unicidade das fracções de globulina. Nessa questão o ponto mais discutido é a posição destacada da euglobulina, pelo que iniciaremos por ahi a nossa exposição.

Sobre as diversas fracções da globulina conhecem-se ainda menos dados do que sobre a globulina total. O quadro a seguir apresenta alguns dos elementos conhecidos.

Conforme essa tabella, somente Porges e Spiro encontraram differenças notaveis, mas tambem estas apenas relativamente ao conteúdo de C e N das duas ultimas fracções. As indicações de Kimura, que não encontrou grandes differenças, coincidem com os resultados das analyses de fracções de globulina de Hartley (63) e Woodmann (64). Alem disso, Woodmann determinou ainda a actividade optica da euglobulina e pseudoglobulina, sem encontrar differença entre as duas fracções.

TABELLA V

Concentração do sulfato de ammonio percentual	C	H	N	S	Auctor
30-37	52.68	7.65	16.03	1.13	Porges e Spiro (23)
37-44	50.48	7.78	15.50	0.98	
44-50	47.52	8.14	14.40	0.92	
25-29	51.38	7.56	16.19	1.28	Kimura (22)
30-36	51.22	7.38	15.98	1.25	
37-43	50.53	7.48	15.90	1.21	
44-50	50.15	7.53	15.83	1.19	

E' completamente errada a separação da globulina em euglobulina e pseudoglobulina de conformidade com a precipitação pelo sulfato de ammonio. Todas as causas de erro na separação das globulinas e albuminas, de que acima já tratámos mais detidamente, desempenham papel muito mais importante, porque a dispersão da globulina é muito mais variavel do que a da albumina, pois a globulina em si já é um corpo albuminoso bem mais labil do que a albumina. Pelas minhas experiencias que, no tocante á precipitabilidade da albumina e da globulina, foram feitas com differentes saes neutros e CH diverso (65), ficou bem evidente que a globulina é muito mais sensivel á variação do CH do que a albumina, o que é indicio de que existe na solução uma verdadeira escala de proporções da globulina.

A quantidade de globulina precipitada por uma certa concentração da solução salina é, por conseguinte, muito mais determinada pelo acaso do que a separação de albumina e globulina. A separação dos saes não constitue, pois, uma prova para a diversidade da globulina e da albumina.

E' muito mais convincente o argumento de a euglobulina ser insoluvel na agua, ao passo que a pseudoglobulina, conforme se observa no quadro III, possue uma conductibilidade que equivale quasi á da agua destillada. Electrodialysando-se uma solução de globulina precipitada com $(NH^4) SO^4$ saturada a 50%, ella não se dissolve por completo, mas fica sempre uma parte do precipitado de albumina que só se dissolve com o addicionamento de pequenas quantidades de sal. Sou de opinião que é exacta a distincção das fracções soluveis e das não soluveis em agua, por ser a solubilidade uma propriedade caracteristica das ligações chimicas. O facto de na composição chimica e na actividade optica não terem sido encontradas differenças não pode ser considerado um argumento tão importante que exclua a pluralidade dos dois corpos albuminosos, tanto mais quanto os resultados das determinações da actividade optica, como já ficou dito, são pouco seguros.

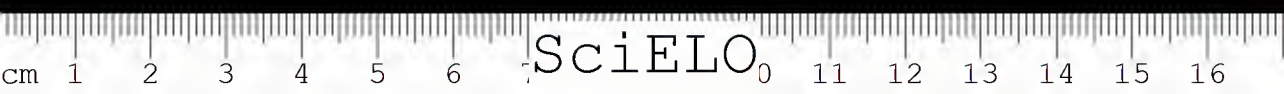
Segundo Hartley (66), tambem se póde dissolver a euglobulina na agua, quando o soro houver sido extrahido pelo processo de Hardy e Gardiner (67). Os resultados de Hartley, porém, não podem comprovar a solubilidade da euglobulina na agua, pois não podemos considerar os corpos albuminosos assim preparados como naturaes. O processo consiste na precipitação dos corpos albuminosos no soro por meio de alcool e ether, sendo o precipitado primeiramente lavado com ether quente e depois seccado no vacuo sobre H^2SO^4. O fim destas experiencias era originalmente a obtenção de corpos albuminosos livres de lipoides. O corpo albuminoso precipitado com saes neutros adsorve uma parte dos lipoides, os quaes, segundo diversos auctores [Mansfeld (68), Forssmann (69), etc.], são muito difficeis de ser separados dos corpos albuminosos. Confirmou-se ainda que os lipoides são adsorvidos principalmente pelas globulinas. Essa determinação — apesar de que nunca foi provado si as globulinas circulantes no sangue adsorvem os lipoides ou não — fez com que alguns auctores,

como Sörensen (70) e Hartley (66), considerassem as globulinas como compostos de corpos albuminosos e lipoides.

O passo seguinte seria examinar-se a parte precipitavel pela passagem da corrente de CO^2, a paraglobulina de Burckhardt, que forma uma parte do precipitado de euglobulina. Sobre as propriedades physicas e physico-chimicas da mesma não estamos ainda bem orientados, não me sendo, porisso, possivel dar uma opinião sobre si este corpo albuminoso forma uma fracção unica, a mais labil da euglobulina, ou si é um corpo albuminoso independente. E' um acido muito mais fraco do que a euglobulina, approximando-se tambem seu ponto isoelectrico muito mais da reacção neutra do que o desta substancia. Esta é a unica explicação razoavel do facto de até um acido tão fraco como o acido carbonico lhe produzir a floculação. Seria de grande vantagem que se fizessem experiencias mais aprofundadas sobre esse ponto.

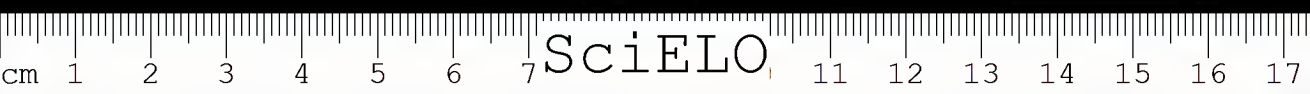
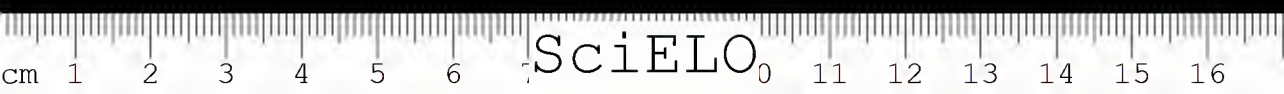
Os dados de que hoje dispomos nos auctorizam apenas a considerar a euglobulina, por ser insoluvel na agua, diversa da pseudoglobulina soluvel na agua. A paraglobulina de Burckhardt — até prova contraria — só pode ser designada como fracção da euglobulina.

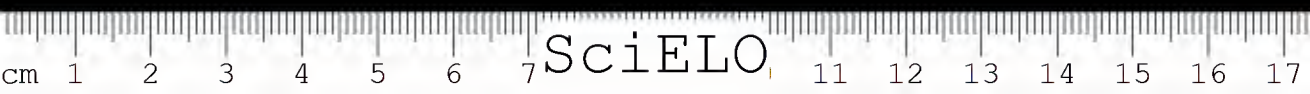
O terceiro e ultimo problema é a questão da subdivisão da pseudoglobulina. Sobre essa questão só temos a dizer que até hoje não ha prova nenhuma que permita estabelecer-se definitivamente a pluralidade da globulina soluvel na agua. Todos os argumentos apresentados a favor do grupamento da pseudoglobulina, como, p. ex., a alteração das differentes fracções nas molestias infectuosas, a distribuição diversa dos corpos immunes e anticorpos, etc., só indicam uma modificação da dispersão, ou da homogeneidade da dispersão, mas de maneira alguma a classificação chimica especifica. E' de lamentar que só se tenham feito muito poucas experiencias physico-chimicas sobre as fracções da globulina precipitaveis em concentrações salinas diversas; essas, porém, como, p. ex., no referido trabalho de Woodmann sobre a capacidade rotativa optica ou nas determinações de Reiner (71) relativas ao ponto isoelectrico, indicam todas o contrario, isto é, a unidade da pseudoglobulina.

O enorme trabalho empregado na identificação dos corpos albuminosos do soro só nos deram resultados positivos quanto á diversidade da globulina e da albumina, contrariando, pois, o principio da transformação de um desses corpos no outro. Em virtude dos resultados actuaes — si bem que pouco satisfactorios — devemos considerar a pseudoglobulina e a euglobulina corpos albuminosos differentes um do outro, mas a subdivisão tanto da pseudoglobulina como da euglobulina em fracções chimicamente distinctas considero-a inexacta e destituida de fundamento. Com isto não quero, entretanto, dizer que a theoria do grupamento mais minucioso seja de todo infundada e inutil, mas sou de opinião que não se podem considerar as diversas fracções como globulinas differentes e independentes. Principalmente no isolamento dos corpos immunes o processo do fraccionamento é utilissimo, porque, segundo as experiencias praticas, os

corpos immunes são precipitados com as globulinas de proporções determinadas; assim, p. ex., esse methodo pode ser de grande utilidade e muito pratico na concentração dos corpos immunes. Não se deve, contudo, perder de vista que a capacidade de adsorpção de um colloide depende principalmente da proporção de suas particulas.

A ultima palavra na questão do fraccionamento das globulinas só pode ser dita quando tivermos uma idéa precisa ao menos sobre o teor de acido aminado de cada fracção.

BIBLIOGRAPHIA

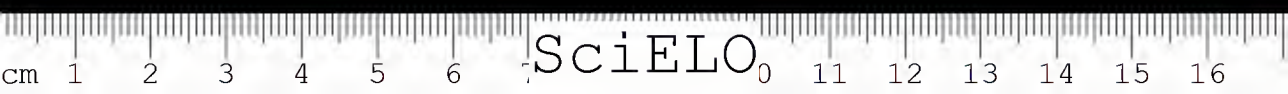
1. *Von Fehling, H.* — Handwoerterbuch der Chemie. I:875.1875. Editor: Vieweg et Sohn. Braunschweig.
2. *Zimmermann, G.* — Arch. für physiol. und pathol. Chemie und Mikroskipie III:197 et 299.1846.
3. *Panum, P.* — Arch. für path. Anat. und Physiol. und für die klin. Medizin III:251.1851.
4. *Panum, P.* — loc. cit. IV:17 et 419.1852
5. *Denis (de Commercy), P. S.; Scherer et Denis* — Annalen der Chemie und Pharmak. XL.1859.
6. *Schmidt, A.* — Arch. für Anat. und Physiol. :428.1862 et Arch. für Physiol. VI:413.1872.
7. *Lehmann* — Lehrbuch der physiol. Chemie :359.1853. 2.ª edição. Leipzig.
8. *Richet, Ch.* — Dictionnaire de Physiol. VIII:206.1907. Editor: Alcan, Paris.
9. *Kühne* — Lehrbuch der physiol. Chemie :168-175.1860. Leipzig.
10. *Eichwald Jr., E.* — Beiträge zur Chemie der gewebsbildenden Substanzen (1).1873 Berlim.
11. *Heynsius, A.* — Arch. für Physiol. II.1869.
12. *Hammarsten, O* — Ergebnisse der Physiol. L:330.1902.
13. *Weyl, Th.* — Zeitschrift für physiol. Chemie I:72.1877-78.
14. *Hoppe — Seyler, E.* — Handbuch der physiol. Chemie :1926.1870. 3.ª edição.
15. *Hammarsten, O.* — Pflügers Archiv XVII:413.1878.
16. *Kauder, G.* — Arch. für exper. Pathol. und Pharm. XX:411.1886.
17. *Burckhardt, E.* — loc. cit. XVI:322.1884.
18. *Marcus, E.* — Zeitschr. für physiol. Chemie XXVIII:559.1899.
19. *Hammarsten, O.* — Pflügers Arch XXX:437.1883.
20. *Doerr, R. et Berger, W.* — Zeitschr. für Hyg. XCVI:191.1922.
21. *Halliburton, W. D.* — J. of Physiol. V:152.1885.
22. *Kimura, R.* — Zeitschr. für Immunitätsforsch. LVI:330.1928.
23. *Porges et Spiro* — Hofmeisters Beitr. III:276.1903.
24. *Robertson, Th.* — J. of biol. Chemistry XIII:455.1912.

25. *Loebner, Ch. et Wreschner* — Deut. Arch. für klin. Med. CXXVII:307.1918.
26. *Galehr., O.* — Wiener Arch. für inn. Med. IX:379.1924.
27. *Gussio* — Tumori X:1.1923.
28. *Hammarsten, O.* — Pflügers Arch. XXII:431.1880.
29. *Michel, A.* — Arbeiten der Würzburger physiol. — Med. Ges. N. Serie XXIX:117.1895.
30. *Starke, K. V.* — Mahlys Jahresb. XI:17.1881.
31 *Maximowitsch, S.* — loc. cit. XXXI:34.1902.
32 *Abderhalden, E.* — Zeitschr. für physiol. Chemie XLIV:17.1905.
33. *Abderhalden, E. et Samuely, F.* — loc. cit. XLVI:193.1905.
34. *Moerner, K.* — Die chem. Konstitution der Eiweisskoerper. 1924. Trad. Matula. Editor: Steinkopff, Dresden.
35. *Abderhalden, E.* — Zeitschr für physiol. Chemie XXXVII:495.1903.
36 *Moerner, K.* — loc. cit. XXXIV:207.1901.
37. *Thomas, K. et Koek, K.* — Zeitschr. für physiol. Chemie LXXXVII:74.1913.
38. *Soerensen, S. P. L.* — Bioch. Zeitschr. VII:43.1907.
39. *Obermayer, F. et Wilhelm, R.* — loc. cit. XXXVIII:331.1912.
40. *Blum, F.* — Zeitschr. für physiol. Chemie XXVIII:288.1899.
41 *Blum, F. et Strauss, E.* — loc. cit. CXII:111.1920 et CXXVII:199.1923.
42. *Csapó, J. et Faubl, J.* — Bioch. Zeitschr. CL:509.1924
43 *Svedberg, Th. et Sjoegren, B.* — J. Amer. Chem. Soc L:3318.1928.
44. *Svedberg, Th.* — Zeitschr. für physik. Chemie CXXVII:51.1927.
45. *Hammarsten, O.* — Lehrb. der physiol. Chemie :207-208.1926. XI.ª edição.
46. *Spiegel-Adolf, M.* — Die Naturwissenschaften. XXXIX:799.1927.
47 *Hafner, E.* — Bioch. Zeitschr. CLXV:424.1925.
48. *Schretter, G.* — loc cit. CLXXVII:335 et 349.1926.
49. *Pauli W. et Valkó, E.* — Die Elektrochemie der Kolloide: 443.1929. Editor: Springer. Wien.
50. *von Klobusitzky, D. et Pauli, W.; von Klobusitzky, D.; von Klobusitzky, D. et von Magyary, C.* — a ser publicado no Bioch. Zeitschr.
51. *von Klobusitzky, D.* — Bioch. Zeitschr. CCXXIII:120.1930.
52. *Noll, L.* — Beitr. chem. Physiol. und Path. IV:563.1904 et VII:311.1906.
53 *Fanconi, G.* — Biochem. Zeitschr. CXXXIX:321.1923.
54. *Ruppel, W. G.; Ornestein, O.; Carl, J. et Lasch, G.* — Zeitschr. für Hygiene XCVII:188.1923.
55. *Jarisch, A.* — Pflügers Arch CXCIV:337.1922.
56. *Katsumura* — Kolloid Zeitschr. XXXII:173.1922.
57 *Gutzeit, K.* — Deutsches Arch. für klin. Med. CXLIII:238.1924.
58. *Adler, E.* — Plasma und Serum. *in* Bethe, A. et von Bergmann, G. — Handbuch der norm. und pathol. Physiol VI(1):235-306.1928. Editor: Springer.
59. *Knipping* et *Kowitz* — Fortschritte auf dem Gebiet der Roentgenstrahlen XXXI:660.1913.
60. *Wichmann, A.* — Zeitschr. für Physiol. Chemie XXVII.
61 *Gürber, A.* — Sitzungsberichte der physik. chem. Gesellschaft zu Würzburg I:43.1894.
62. *Schulz, N.* — Abderhalden, E. Handbuch der biol. Arbeitsmethoden I(8):458.1922. Editor: Urban et Schwarzenberg, Berlin et Wien.
63. *Hartley, P.* — Bioch. Journ. VIII:541.1914.
64 *Woodmann, H. E.* — loc. cit. XV:187.1921.
65. *von Klobusitzky, D.* — Bioch. Zeitschr. CCIX:304.1929.
66. *Hartley, P.* — Brit. J. Exper. Pathol. VI:180.1925
67. *Hardy, W. B. et Gardiner, S.* — J. of Physiol XLI:180.1911.
68. *Mansfeld, G.* — Zentralbl. für Physiol. XXI:666.1908.

69. *Forssmann, J.* — Bioch. Zeitschr. CXXI:180.1921.
70. *Scerensen, S. P. L.* — C. R. Trav. Lab. Carlsberg XI:15.1925.
71. *Reiber, L.* — Bioch. Zeitschr. CXCI:158.1927.

(Trabalho da Secção de Physico-Chimica do Instituto Butantan, terminado em março de 1931 e publicado em alemão in Kolloidchem.Beihefte XXXII (7-12): 382-402.1931).

UM ELECTRO-ULTRAFILTRO MODIFICADO

POR
DIONYSIO VON KLOBUSITZKY

542.67:621.352.9:612.398.12

UM ELECTRO-ULTRAFILTRO MODIFICADO

POR

DIONYSIO VON KLOBUSITZKY

A electro-ultrafiltração de Bechhold (H. Bechhold- *in* Zschr. f. physik. Chemie LX:257.1907) que, como é sabido, dá rapida dialyse concentrando ao mesmo tempo a solução, sendo, por isso, de grande utilidade num laboratorio de chimica e de physico-chimica, tem para nós a desvantagem de ser feita com apparelhos de porcellana Bechhold-König, somente fabricada na Alemanha. Isso torna necessaria a compra de peças sobresalentes ou, em caso de alguma quebrar, a interrupção do trabalho por certo tempo. A primeira alternativa é muito dispendiosa e a segunda atrapalha a pesquisa. Meu objectivo foi, portanto, construir um electro-ultrafiltro com peças de uso e montagem faceis.

Como orientação servi-me do electro-ultrafiltro de Bechhold, modelo grande, com sucção numa só direcção. Usei como recipiente para a solução um cylindro de vidro forte tendo um gargalo numa das extremidades. Este recipiente é fechado com uma membrana de pergaminho amarrada por um barbante, afim de evitar a entrada de agua, podendo-se, caso seja necessario, parafinar ou então cobrir, com uma camada de uma mistura derretida de cera e colophonia, a parte superior do pergaminho. No recipiente colloca-se uma vela de porcellana de qualquer fabricante (*). Esta vela é toda vidrada com excepção da parte de baixo. E' fechada com uma rolha de borracha contendo dois furos, num dos quaes está ligado um electrodo de platina, chegando até o fundo e, no outro, um tubo de vidro em forma de ┐, tambem chegando até o fundo. A parede de baixo da vela é, como no recipiente de Bechhold-König, primeiramente embebida numa solução a 10% de collodio em acido acetico e depois endurecida e lavada em agua até desapparecerem todos os traços de acido. Assim ficam os dois recipientes impermeaveis a colloides. Debaixo da membrana de perga-

---

(*) As velas empregadas foram fabricadas e offerecidas a titulo de experiencia pelo sr. Ranzini (São Paulo), tendo ellas dado bons resultados. Assim, este Instituto só tem a agradecer a gentileza desse industrial.

minho colloca-se um electrodo de prata; no recipiente de vidro, um agitador e um thermometro, sendo todo o apparelho immerso numa vasilha contendo agua destillada. Liga-se a uma corrente continua, no maximo de 110 Volts e 0,5 Ampères: o polo positivo, ao electrodo interno de platina; o polo negativo, ao externo de prata. O tubo em forma de ┐ é ligado a uma trompa de agua. A reacção do soluto que dialysa pode ser regulada pela intensidade da sucção. Quando o colloide contém electrolytos, precisa-se augmentar a distancia do electrodo de prata á membrana de pergaminho, afim de evitar que aqueça e assim coagule. No mais a manipulação, a especie de dialyse, a capacidade funccional são iguaes ás do apparelho de Bechhold.

A montagem do apparelho pode ser vista no eschema annexo.

RESUMO

Descreve-se e figura-se um apparelho para electro-ultrafiltração, de uso e montagem faceis.

(Trabalho da Secção de Physico-chimica do Instituto Butantan, dezembro de 1931, a ser publicado em inglês in J. of Physical Chemistry XXXVI(12).1932).